

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Uso de un circuito genético de retroalimentación positiva para el estudio de la señalización de la ruta de integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae* y la identificación de nuevos antifúngicos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Elena Jiménez Gutiérrez

DIRECTORES

María Molina Martín
Humberto Martín Brieva

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**USO DE UN CIRCUITO GENÉTICO DE RETROALIMENTACIÓN POSITIVA
PARA EL ESTUDIO DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA RUTA DE INTEGRIDAD
CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* Y LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS
ANTIFÚNGICOS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

ELENA JIMÉNEZ GUTIÉRREZ

DIRECTOR

MARÍA MOLINA MÁRTÍN
HUMBERTO MARTÍN BRIEVA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**USO DE UN CIRCUITO GENÉTICO DE RETROALIMENTACIÓN POSITIVA
PARA EL ESTUDIO DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA RUTA DE INTEGRIDAD
CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae* Y LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS
ANTIFÚNGICOS**

Memoria para optar al Grado de Doctor

presentada por

Elena Jiménez Gutiérrez

Directores

María Molina Martín

Humberto Martín Brieva

Madrid, 2021

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- BIO2013-44112-P: “Identificación de nuevos componentes y reconfiguración de circuitos de señalización en *Saccharomyces cerevisiae*“, subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2014-2016).
- BIO2016-75030-P. “Reprogramación celular por fosforilación dependiente de la MAPK Slt2 e integración de un módulo de señalización por receptores de tipo Toll en *Saccharomyces cerevisiae*“, subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2016-2019).
- B2017/BMD-3691: “InGEMICS-CM: Ingeniería Microbiana, Salud y Calidad de Vida“, subvencionado por la Comunidad Autónoma de Madrid (2018-2022).
- PID2019-105342GB-I00: "Ensamblaje y estudio de complejos de señalización endógenos y heterólogos en el modelo *Saccharomyces cerevisiae*: aplicación al análisis funcional y descubrimiento de fármacos", subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2020-2023).

Así como a la concesión a la doctoranda de los siguientes contratos:

- Ayudas para Contratos Predoctorales de Personal Investigador en Formación (Convocatoria 2017- CT17/17), por parte de la Universidad Complutense de Madrid (16/04/2018-15/04/2022).
- Personal de Apoyo a la Investigación (PAI), con cargo al proyecto de investigación BIO2013-44112-P) (15/02/17-31/12/17).

Y a la estancia breve realizada en el laboratorio dirigido por el Dr. Colman-Lerner en el centro de investigación IFIBYNE (Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias), perteneciente a la Universidad de Buenos Aires (UBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina (16-10-2019-16-01-2020).

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis Humberto y María por acogerme hace tantos años en el grupo, cuando era una estudiante de tercero de Bioquímica con ganas de saber cómo era esto de investigar de verdad. Tanto ellos como Víctor me han enseñado a ser una buena profesional, pero sobre todo me han guiado en este proceso, no siempre bonito, de iniciar una carrera investigadora, y les tendré como referentes eternamente.

Este trabajo se lo debo también a todos los integrantes de la familia Utresiana, pasados y presentes, nacionales e internacionales, pero en concreto he de mencionarlas a Ellas: Isa, Tere, Julia, Gema, Ángela, Elba, Marta, Bea, Lucía y Sara, porque han provocado que durante este periodo de mi vida tenga una sonrisa permanente, hacen que lo malo sea muchísimo menos malo y me han ayudado lo indecible. He de agradecer por supuesto a mi mentora Esme, que me ha enseñado prácticamente todo lo que sé y su excelente trabajo ha dado pie a esta tesis. Sin embargo, hay una persona a la que considero mi otra mitad, mi “Mili”, que no solo me ha proporcionado dos manos más para sacar adelante todas las improbables “pruebecitas” que han ido surgiendo a lo largo de estos años, sino que me ha levantado cuando me he caído, ha apagado mis fuegos y me ha ayudado a limpiar el rojo Congo derramado. Por todo ello y más, gracias Esti.

No obstante, la U3 no se entiende sin el resto del departamento, dirigido por la siempre dispuesta Gloria y al que hacen funcionar los incondicionales Benito, José Alberto y Elena, así como Inma, Mar y Almu. Todos ellos son los ángeles de la guarda que nos conceden todos los deseos que les pedimos, que no son pocos...

Además, quiero agradecer a todos los ACL, y en especial a Alejandro, por brindarme la oportunidad de aprender en su laboratorio durante tres maravillosos meses en Buenos Aires, de los que me llevo múltiples conocimientos e inolvidables experiencias.

No puedo olvidarme tampoco de Carmen y Pepe, que me han inculcado su devoción por la ciencia y cuyos consejos me han traído hasta aquí.

Esta etapa no ha sido solo estar encerrada en el laboratorio, también ha habido momentos de desahogo, y uno de ellos son las clases de pádel de los viernes con Ana y Moni, que han hecho de estas clases lo más esperado de la semana. Nos debemos un viaje a París, entre otros muchos ♥.

Por otro lado, los que están siempre para mí y a los que les debo la vida, en sentido literal y figuradamente, son mis padres, que, aunque no sepan definir exactamente a qué me dedico, me han apoyado en todas las decisiones importantes y sé que lo harán de aquí en adelante.

En cuanto a la familia que se elige, estoy segura de que elegí bien en su momento porque las amigas que hice en el colegio me acompañan hoy en día, y una de ellas, María, la mejor diseñadora gráfica que conozco, ha sido la que ha diseñado, entre otras cosas, la preciosa portada de esta tesis. Del mismo modo, durante la carrera y el máster he tenido la inmensa suerte de coincidir con un grupo de personas con las que sé que podré contar tanto para preguntar dudas científicas o pedir protocolos como para perdernos por el mundo.

Finalmente, quiero dar las gracias a Álvaro por estar a mi lado todo este tiempo, a pesar de que no siempre ha sido fácil, y espero que sea mi compañero y amigo en el resto de mis proyectos de vida.

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	13
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN.....	25
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo biológico de eucariotas	27
2. Las rutas de señalización mediadas por MAPKs.....	27
2.1. La ruta de crecimiento en alta osmolaridad o ruta HOG (<i>High Osmolarity Glycerol</i>).....	29
2.1.1. La rama SLN1	31
2.1.2. La rama SHO1	32
2.1.3. Pbs2: elemento de convergencia de las dos ramas de la ruta HOG	35
2.1.4. Respuesta transcripcional de la ruta HOG	36
2.1.5. Regulación de la señalización de la ruta HOG	37
2.2. La ruta de integridad de la pared celular o CWI (<i>Cell Wall Integrity</i>)	38
2.2.1. Función y estructura de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	38
2.2.2. Componentes de la ruta CWI.....	40
2.2.2.1. Sensores.....	41
2.2.2.2. Rho1	44
2.2.2.3. Pkc1	45
2.2.2.4. Módulo de MAPKs	48
2.2.2.5. Respuesta transcripcional de la ruta CWI	49
2.2.2.6. Activación de la ruta CWI.....	51
2.2.2.7. Regulación de la ruta CWI.....	56
3. La biología sintética aplicada al estudio de las vías de señalización de MAPKs	58
4. El arsenal antifúngico actual y la búsqueda de nuevas moléculas mediante estrategias de reposicionamiento de fármacos	58
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	61
MATERIALES Y MÉTODOS.....	5867

1. Microorganismos empleados.....	69
2. Medios y condiciones generales de incubación de los microorganismos.....	71
3. Determinación del crecimiento celular.....	72
4. Conservación de los microorganismos.....	73
5. Técnicas básicas de biología molecular.....	73
6. Cultivo y recogida de las células de levadura.....	75
7. Detección de proteínas mediante <i>Western blotting</i>	76
7.1. Obtención de los extractos proteicos	76
7.2. Electroforesis PAGE-SDS, transferencia a la membrana de nitrocelulosa e inmunodetección de las proteínas.....	76
8. Ensayo de determinación de la actividad β -galactosidasa.....	78
9. Co-purificación de proteínas	79
10. Análisis de sensibilidad celular	79
10.1. Ensayo de crecimiento de diluciones decimales seriadas	79
10.2. Estudio de la sensibilidad celular en placa multipocillo.....	80
10.3. Ensayo de halo de inhibición.....	80
11. Rastreo de la colección de compuestos <i>Prestwick Chemical Library</i> ®	80
11.1. Búsqueda de moléculas estimuladoras de la ruta CWI.....	81
11.2. Búsqueda de moduladores negativos de la ruta CWI	81
12. PCR de transcripción reversa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	82
13. Microscopía de fluorescencia	83
13.1. Microscopía de fluorescencia para el análisis del reportero transcripcional pSTL1- YFP	83
13.2. Determinación de la localización subcelular de Hog1-Venus.....	84
14. Soporte bioinformático	85
RESULTADOS.....	87
1. Caracterización del circuito genético sintético de amplificación de la señal de la ruta de integridad celular o IPAC (<i>Integrity Pathway Activation Circuit</i>).....	89

1.1. El circuito IPAC promueve la inhibición del crecimiento de manera dependiente de la activación de Rlm1	89
1.2. El circuito IPAC induce incrementos en la fosforilación de Slt2 y activación transcripcional de manera dependiente de la intensidad del estímulo	90
1.3. La integración genómica del IPAC en la cepa Y3656 genera una mayor hiperactivación de la ruta CWI y una mayor sensibilidad a zimoliasa	92
1.4. La presión selectiva del medio es necesaria para que el IPAC portado en un plásmido centromérico genere sensibilidad a compuestos que alteran la pared celular	94
2. Determinación de la implicación de las rutas de MAPKs CWI y HOG en la respuesta celular inducida por el detergente aniónico SDS.....	97
2.1. El detergente SDS da lugar a la activación del circuito debido a su naturaleza aniónica	97
2.2. La señalización del SDS hacia Slt2 requiere la contribución conjunta de los módulos de MAPKs de las rutas CWI y HOG	98
2.3. El eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG permite la activación del módulo de MAPKs de la ruta CWI en respuesta a SDS	100
2.4. Ssk2 no interviene en la respuesta de la ruta CWI al estrés hiperosmótico y a la latrunculina B.....	102
2.5. El SDS no induce la activación transcripcional de la ruta HOG	104
2.6. La MAPK Hog1 no requiere su translocación al núcleo para conducir la señalización del SDS a la ruta CWI.....	106
2.7. El entrecruzamiento entre las rutas HOG y CWI se produce desde Hog1 a través de Bck1	109
2.8. Las proteínas de los módulos de MAPKs de las rutas HOG y CWI se asocian entre sí formando un complejo	111
3. Estudio de la respuesta celular frente al aminoglucósido neomicina y la función de la ruta CWI en la misma	115
3.1. La neomicina induce inhibición del crecimiento por la activación del circuito IPAC	115
3.2. La neomicina provoca un incremento de fosforilación de Slt2 en células con y sin IPAC	117

3.3. La cicloheximida solo activa a la versión integrada del circuito IPAC.....	118
3.4. La señalización inducida por neomicina requiere la funcionalidad de varias rutas de señalización.....	120
3.5. El factor de transcripción Rlm1 se activa débilmente por neomicina	124
4. Empleo del circuito IPAC en el rastreo de una colección comercial de moléculas en busca de nuevos activadores y reguladores negativos de la ruta CWI	127
4.1. El circuito IPAC es activado de forma específica por seis antipsicóticos, dos antibacterianos, dos antifúngicos, un anestésico, un antiespástico y un vasodilatador	128
4.2. La activación por RC del circuito IPAC es interrumpida por 27 fármacos de la colección <i>Prestwick Chemical Library</i> ®.....	135
DISCUSIÓN.....	141
1. Utilidad del circuito genético sintético IPAC de amplificación de la señal de la ruta CWI como herramienta para el estudio de la señalización a través de esta ruta	143
2. El eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG contribuye a la activación del módulo de MAPKs de la ruta CWI en respuesta al detergente aniónico SDS	145
3. El aminoglucósido neomicina induce la activación de la ruta CWI, y la respuesta celular frente a este compuesto implica a varias rutas de transducción de señales	149
4. El rastreo de una colección comercial de fármacos mediante el uso del circuito IPAC ha permitido la identificación de nuevas moléculas estimuladoras y moduladoras negativas de la ruta CWI	152
CONCLUSIONES.....	159
CONCLUSIONS	163
BIBLIOGRAFÍA.....	167
ANEXO I.....	201
ANEXO II	2021

ABREVIATURAS

A	aa	Aminoácido
	ATP	Adenosín trifosfato (<i>Adenine Triphosphate</i>)
B	BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	cDNA	DNA complementario
	CFW	Blanco de calcoflúor (<i>Calcofluor White</i>)
	CRD	Dominio rico en Cys (<i>Cysteine Rich Domain</i>)
	CRIB	Dominio de unión de p21 (<i>Cdc42/Rac-Interactive Binding</i>)
	CS	Quitín sintasa (<i>Chitin Synthase</i>)
	C-terminal	Carboxi-terminal
	CWI	Ruta de integridad celular (<i>Cell Wall Integrity</i>)
	CWP	Proteína de la pared celular (<i>Cell Wall Protein</i>)
D	DAG	Diacilglicerol
	D.O.	Densidad Óptica
	DMSO	Dimetilsulfóxido
	DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
	DSP	Thr/Ser fosfatasa de especificidad dual (<i>Dual-Specificity Phosphatase</i>)
	DTT	Ditiotreitol
E	EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
F	FIG	Ruta de filamentación y crecimiento invasivo (<i>Filamentous and Invasive Growth</i>)
G	G418	Geneticina
	G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (<i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i>)
	GAP	Proteína activadora de GTPasa (<i>GTPase Activating Protein</i>)
	GDI	Inhibidor de la disociación de nucleótidos de guanina (<i>Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor</i>)
	GDP	Guanosina difosfato (<i>Guanosine Diphosphate</i>)
	GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>)
	GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
	GlcNAc	N-acetilglucosamina
	GPI	Glicosilfosfatidilinositol (<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>)
	GST	Glutación S-Transferasa
	GTP	Guanosina trifosfato (<i>Guanosine Triphosphate</i>)
	GTPasa	Guanosina trifosfatasa
H	H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
	HK	Histidina quinasa (<i>Histidine Kinase</i>)
	HMH	<i>Hkr1-Msb2 Homology</i>
	HOG	Ruta de alta osmolaridad (<i>High Osmolarity Glycerol</i>)
	Hog1 ^{KM}	Hog1 catalíticamente inactiva
	Hog1 ^{TA/YA}	Hog1 no fosforilable
	HR	<i>Homology Region</i>
	HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
I	IPAC	Circuito de amplificación de la señal de la ruta CWI (<i>Integrity Pathway Activation Circuit</i>)
L	LatB	Latrunculina B
	LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
M	MADS	<i>MCMI, Agamous, Deficiens, Serum response factor</i>
	MAPK	Proteín quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
	MAPKK	MAPK quinasa quinasa (<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i>)

ABREVIATURAS

	MAPKKK	MAPK quinasa quinasa quinasa (<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i>)
	MCW	<i>Membrane Compartment occupied by Wsc1</i>
	MDR	<i>Multidrug-Resistant</i>
	mRNA	RNA mensajero
N	NEO	Sulfato de neomicina
	NES	Señal de exportación nuclear (<i>Nuclear Export Signal</i>)
	NLS	Señal de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
	NMDA	Receptor <i>N</i> -metil-D-aspartato
	N-terminal	Amino-terminal
O	ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosido
P	PAK	Proteín quinasa activada por p21 (<i>p21 Activated Kinase</i>)
	PBS	Buffer fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
	Pbs2 ^{EE}	Pbs2 constitutivamente activa
	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
	PDK	Proteín quinasa dependiente de 3-fosfoinosítidos (<i>3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase</i>)
	PEG	Polietilenglicol
	PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
	pH	Potencial de hidrógeno
	PH	Dominio de homología de pleckstrina (<i>Pleckstrin homology</i>)
	P-Hog1	Hog1 fosforilada
	PI	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol</i>)
	PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
	PIP ₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
	PKA	Proteín quinasa A (<i>Protein Kinase A</i>)
	PKC	Proteín quinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)
	PLC	Fosfolipasa C (<i>Phospholipase C</i>)
	PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>)
	PP2C	Ser/Thr fosfatasas de tipo 2C (<i>Protein Ser/Thr Phosphatase 2C</i>)
	PS	Fosfatidilserina (<i>Phosphatidylserine</i>)
	PSA	Persulfato amónico
	P-Slt2	Slt2 fosforilada
	PTP	Proteín tirosín fosfatasa (<i>Protein Tyrosine Phosphatase</i>)
R	r.p.m.	Revoluciones por minuto
	RC	Rojo Congo
	Rho	<i>Ras-homologous</i>
	RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
	ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
	RT-qPCR	PCR de transcripción reversa cuantitativa a tiempo real (<i>Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR</i>)
S	SAPK	Proteín quinasa activada por estrés (<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>)
	SBF	<i>SCB (Swi4/Swi6-dependent Cell cycle Box) Binding Factor</i>
	SD	Medio sintético de crecimiento de levaduras con glucosa (<i>Synthetic Dextrose</i>)
	SDS	Docecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
	SG	Medio sintético de crecimiento de levaduras con galactosa (<i>Synthetic Galactose</i>)
	SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
	SH3	<i>Src Homology 3</i>

	SR	Medio sintético de crecimiento de levaduras con rafinosa (<i>Synthetic Raffinose</i>)
	Ssk2 ^{ΔN}	Ssk2 constitutivamente activa
	STR	Región rica en residuos de Ser/Thr (<i>Ser/Thr Rich</i>)
T	TA	Temperatura ambiente
	TAE	Solución Tris-Acetato-EDTA
	TEMED	Tetrametiletilenediamina
	TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
	TORC2	<i>TOR Complex 2</i>
	T-PBS	Solución PBS-Tween-20 al 0.1%
U	UV	Ultravioleta
V	v/v	Volumen en volumen
Y	YPD	Medio rico de crecimiento de levaduras (<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>)
	YPG	Medio rico de crecimiento de levaduras con galactosa (<i>Yeast extract Peptone Galactose</i>)
Z	ZIM	Zimoliasa
	Δ	Delección
	°C	Grado centígrado

RESUMEN

Uso de un circuito genético de retroalimentación positiva para el estudio de la señalización de la ruta de integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae* y la identificación de nuevos antifúngicos

Introducción

Las rutas de transducción de señales mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) son esenciales para la viabilidad celular, porque permiten detectar los cambios que se producen en el entorno extracelular y generar una respuesta adaptativa adecuada para hacerlos frente. Estas rutas están ampliamente distribuidas en las células eucarióticas, y se componen de un módulo de tres proteínas quinasas, la MAPKKK, la MAPKK y la MAPK, que se activan por fosforilación secuencial. En general, el estímulo es detectado por sensores que se encuentran en la superficie celular y transducen la señal a los siguientes componentes de la ruta, normalmente una GTPasa y una proteína quinasa, que es la que activa al módulo de MAPKs. Finalmente, la MAPK activa fosforila a su vez a una serie de efectores, en su mayoría factores de transcripción, que dan lugar a la respuesta adaptativa. El elevado grado de conservación de las rutas de MAPKs entre eucariotas hace de *Saccharomyces cerevisiae* un excelente modelo para su estudio. Esta levadura presenta cinco rutas mediadas por MAPKs, entre las que se encuentran la ruta de integridad de la pared celular o CWI (*Cell Wall Integrity*) y la de alta osmolaridad o ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*). Mientras que la segunda se encarga de la supervivencia celular en condiciones de estrés hiperosmótico, la primera es la responsable del mantenimiento de la integridad de la pared celular fúngica, estructura fundamental para las células de levadura, lo que la convierte en una buena diana de antifúngicos.

Antecedentes y objetivos

Para estudiar la señalización a través de la ruta CWI, nuestro grupo de investigación desarrolló un circuito genético sintético de retroalimentación positiva denominado IPAC (*Integrity Pathway Activation Circuit*), cuya activación en condiciones de estimulación se traduce en la inhibición del crecimiento debida a la hiperactivación de la ruta CWI. Mediante el uso de esta herramienta genética, se observó que la señalización a través de la ruta CWI promovida por el detergente dodecilsulfato sódico (SDS) requería los genes *SSK2*, *PBS2* y *HOG1* de la ruta HOG. Además, en un rastreo para la búsqueda de nuevos estímulos de la

ruta CWI, se identificó a la neomicina como un aminoglucósido capaz de activar al circuito IPAC.

Considerando estos antecedentes, los objetivos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

- Caracterizar la dinámica de activación del circuito IPAC.
- Analizar el entrecruzamiento entre las rutas CWI y HOG en la señalización estimulada por SDS.
- Estudiar la respuesta celular a la neomicina y la función de la ruta CWI, así como de otras vías de señalización, en dicha respuesta.
- Rastrear una colección comercial de compuestos para la búsqueda de nuevos activadores y reguladores negativos de la ruta CWI, siguiendo una estrategia de reposicionamiento de fármacos.

Resultados

La activación del circuito IPAC generó una señalización amplificadora a través de la ruta CWI, y este efecto se vio potenciado mediante la integración de esta construcción genética en el genoma de la levadura. La exposición celular a SDS indujo la fosforilación de la MAPK de la ruta CWI Slt2, y se observó que en este proceso participan, además del resto de elementos del módulo de MAPKs de esta ruta, el módulo de MAPKs de la ruta HOG constituido por Ssk2, Pbs2 y Hog1. Este modelo de activación secuencial de ambas rutas por SDS no implica la translocación de Hog1 al núcleo ni la activación transcripcional de la ruta HOG, pero podría estar favorecido por la interacción múltiple entre los componentes de ambos módulos de MAPKs. Por otro lado, se demostró que la ruta CWI es necesaria para la supervivencia de las células de levadura en presencia de neomicina. En la señalización inducida por este aminoglucósido a través de la ruta CWI, aparte del eje Ssk2-Pbs2-Hog1, contribuyen la quinasa Pkh1 de la ruta de síntesis de esfingolípidos y la proteína de unión a PIP₂ Slm1, que participa en la ruta de TORC2. Finalmente, utilizando células con el circuito IPAC integrado como plataforma para el rastreo de la colección comercial de compuestos *Prestwick Chemical Library*® en busca de moléculas con actividad antifúngica, se identificaron 13 activadores y 27 inhibidores de la ruta CWI.

Conclusiones

1. El circuito IPAC de retroalimentación positiva promueve la inhibición del crecimiento en condiciones de estimulación de la ruta CWI debido a una hiperactivación de Slt2 de manera dependiente de la intensidad del estímulo.
2. La integración genómica del IPAC genera una mayor fosforilación de la MAPK Slt2 y una mayor actividad transcripcional de la ruta CWI mediada por el factor de transcripción Rlm1 que el IPAC en un vector centromérico.
3. En la señalización del detergente aniónico SDS, el eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG participa en la activación del módulo de MAPKs de la ruta CWI, si bien en estas condiciones no se produce la translocación al núcleo de la MAPK Hog1 ni la activación transcripcional de la ruta HOG.
4. Las proteínas del módulo de MAPKs de la ruta HOG Pbs2 y Hog1 interaccionan físicamente con todos los componentes del módulo de MAPKs de la ruta CWI, lo que apoya la existencia del entrecruzamiento entre estas dos rutas mediante la formación de un macrocomplejo de señalización.
5. A diferencia de otros inhibidores de la síntesis proteica, el aminoglucósido neomicina activa al circuito IPAC inhibiendo el crecimiento celular, por lo que se trata de un estímulo de la ruta CWI.
6. En presencia de neomicina, la respuesta transcripcional dependiente de Rlm1 se activa débilmente, lo que explica una menor activación del IPAC en comparación con la que provoca el rojo Congo. Esto podría deberse en parte a la inhibición de la síntesis proteica causada por este aminoglucósido.
7. En la activación de Slt2 por neomicina participan, además de los elementos canónicos de la ruta CWI, el módulo Ssk2-Pbs2-Hog1, la proteína quinasa Pkh1 y la proteína de unión a PIP₂ Slm1.
8. En el rastreo con el circuito IPAC de los 1,280 compuestos de la colección *Prestwick Chemical Library*®, un 3.6% del total mostró actividad antifúngica independientemente del circuito, un 1.0% fue capaz de estimular la ruta CWI y un 2.1% inhibió la señalización a través de dicha ruta.

9. El circuito IPAC es una herramienta muy útil para la identificación de moléculas con potencial actividad terapéutica cuya diana sea la superficie celular fúngica o las rutas de MAPKs.

SUMMARY

Use of a synthetic positive feedback circuit for the study of the cell wall integrity signalling pathway in *Saccharomyces cerevisiae* and the identification of new antifungals

Introduction

Signalling pathways mediated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are essential for cell survival due to their ability to detect changes in the extracellular environment and adaptively respond to them. MAPK pathways are widely distributed among eukaryotic cells and are composed of a three-tiered-protein kinase module, comprising a MAPKKK, a MAPKK, and a MAPK, which are activated by sequential phosphorylation. In general, the stimulus is detected by sensors on the cell surface. They transduce the signal to downstream components of the route, usually a GTPase and a protein kinase, which in turn activates the MAPK module. Lastly, the active MAPK phosphorylates its effectors, mostly transcription factors, which elicit the adaptive response. The high conservation of MAPK pathways among eukaryotes makes the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* an excellent model for their study. This microorganism presents five MAPK pathways, including the Cell Wall Integrity (CWI) pathway and the High Osmolarity Glycerol (HOG) pathway. These are responsible for the maintenance of the integrity of the fungal cell wall, an essential cell structure that constitutes an attractive antifungal target, and ensuring cellular growth under hyperosmotic stress conditions, respectively.

Background and Objectives

To study the CWI signalling pathway, our research group developed a synthetic positive feedback circuit named 'Integrity Pathway Activation Circuit (IPAC)'. Its activation under stimulating conditions results in growth inhibition due to the hyperactivation of the CWI pathway. Using this genetic tool, we observed that signalling through the CWI pathway induced by the detergent sodium dodecyl sulfate (SDS) required the HOG genes *SSK2*, *PBS2*, and *HOG1*. Additionally, in a screening to search for new CWI pathway stimuli, we found that the aminoglycoside neomycin activates the IPAC circuit.

Based on these previous results, the objectives of this doctoral thesis were the following:

- To characterize the IPAC circuit activation dynamics.
- To analyse the crosslinking between the CWI and the HOG pathways in the SDS-stimulated signalling.

SUMMARY

- To study the cellular response against neomycin and the role of the CWI pathway and other signalling pathways in this response.
- To screen a collection of commercial compounds to find new CWI pathway activators and negative regulators, following a drug repositioning strategy.

Results

The activation of the IPAC circuit generated amplified signalling through the CWI pathway, and this effect was fostered by the integration of this genetic construction in the yeast genome. SDS treatment induced phosphorylation and, thus, activation of Slt2, the CWI pathway MAPK. We found that, besides the elements of the MAPK module of this route, the HOG pathway MAPK module, constituted by Ssk2, Pbs2, and Hog1, was also involved in this phenomenon. The sequential activation of both pathways by SDS involves neither Hog1 nuclear translocation nor HOG pathway transcriptional activation, but it could be favoured by the multiple interactions established among the components of both MAPK modules. We also demonstrated that the CWI pathway is necessary for yeast cell survival in the presence of neomycin. However, components from other signalling pathways such as the Ssk2-Pbs2-Hog1 axis, the Pkh1 kinase from the sphingolipid synthesis pathway, or the PIP₂ binding protein Slm1 from the TORC2 pathway participate in the neomycin-induced signalling through the CWI pathway. Finally, we identified 13 activators and 27 inhibitors of the CWI pathway using yeast cells bearing the integrated IPAC circuit as a platform to screen the *Prestwick Chemical Library*®.

Conclusions

1. The synthetic positive feedback circuit IPAC inhibits growth under CWI pathway stimulation due to Slt2 hyperactivation in a stimulus intensity-dependent manner.
2. The IPAC genomic integration promotes higher MAPK Slt2 phosphorylation levels and CWI pathway transcriptional activation mediated by the transcription factor Rlm1 than the IPAC expressed from centromeric vectors.
3. In the SDS-induced signalling, the HOG pathway Ssk2-Pbs2-Hog1 axis participates in the CWI pathway MAPK module activation, even though under these conditions there is neither nuclear translocation of the MAPK Hog1 nor HOG pathway transcriptional activation.

4. The HOG pathway MAPK module proteins Pbs2 and Hog1 physically interact with all the components of the CWI pathway MAPK module, which supports the existence of crosslinking between these two pathways through the formation of a signalling macrocomplex.
5. In contrast with other protein synthesis inhibitors, the aminoglycoside neomycin activates the IPAC circuit and inhibits cell growth, proving its ability to stimulate the CWI pathway.
6. The Rlm1-dependent transcriptional response is slightly activated in the presence of neomycin, which explains the lower activation of the IPAC as compared to that elicited by Congo red. This could be in part due to the protein synthesis inhibition caused by this aminoglycoside.
7. In addition to the canonical CWI pathway elements, the Ssk2-Pbs2-Hog1 module, the protein kinase Pkh1, and the PIP₂ binding protein Slm1 also participate in Slt2 activation induced by neomycin.
8. In a screening of 1,280 compounds from the *Prestwick Chemical Library*® using yeast cells bearing the IPAC, 3.6% of the total showed antifungal activity independently of the circuit, 1.0% stimulated the CWI pathway, and 2.1% inhibited signalling through this pathway.
9. The IPAC circuit is a useful tool for the identification of molecules with antifungal therapeutic potential whose target is either the cell surface or a MAPK signalling pathway.

INTRODUCCIÓN

1. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico de eucariotas

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo eucariótico unicelular de fácil manipulación, ya que es inocuo y no demanda muchos requerimientos nutricionales para crecer. Presenta un tiempo de duplicación por gemación de 90 minutos, aproximadamente, en condiciones óptimas de laboratorio (Amberg and Burke, 2016). Además, esta levadura se encuentra genéticamente bien definida, se conoce la secuencia de su genoma entero y las bases de datos correspondientes son generalmente de libre acceso. Asimismo, se trata de un organismo susceptible a su modificación genética. Por este motivo, y con el objetivo de poder estudiar la expresión y funcionalidad de todos los genes y sus productos génicos, se han construido diversas colecciones de plásmidos y cepas de levadura, como, por ejemplo, de mutantes delecionados en genes no esenciales, o de genes marcados con diferentes epítomos o proteínas fluorescentes, entre otras (Duina *et al.*, 2014; Mager and Winderickx, 2005).

Desde su aislamiento a finales del siglo XIX hasta ahora, *S. cerevisiae* se ha convertido en la levadura más empleada, no solo en diversos procesos industriales como factoría celular (Parapouli *et al.*, 2020), sino también para el estudio de aspectos fundamentales de la biología celular eucariótica. El éxito del uso de la levadura como organismo modelo radica en el alto grado de conservación de la maquinaria implicada en múltiples procesos celulares entre este microorganismo y los eucariotas superiores. Tanto es así, que el 47% de los genes esenciales de levadura presenta un ortólogo humano (Nielsen, 2019). Un ejemplo de conservación entre eucariotas inferiores y superiores son las rutas de señalización celular.

2. Las rutas de señalización mediadas por MAPKs

Las células eucarióticas habitan en medios en constante cambio, y para poder garantizar su supervivencia es imprescindible la existencia de mecanismos capaces de detectar y hacer frente de manera específica a esas variaciones del ambiente, sobre todo en el caso de las especies inmóviles, como los hongos unicelulares o levaduras. Uno de estos sistemas de vigilancia son las rutas de señalización mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos o MAPKs. Estas vías de señalización se encuentran ampliamente distribuidas en las células de todos los organismos eucarióticos con un alto grado de conservación evolutiva (Widmann *et al.*, 1999).

INTRODUCCIÓN

Todas las rutas mediadas por MAPKs comparten un módulo de señalización finamente regulado, denominado cascada o módulo de MAPKs, que consiste en tres proteínas quinasas consecutivas que se activan por fosforilación secuencial (Krishna and Narang, 2008). El primer componente de este módulo es la MAPK quinasa quinasa o MAPKKK. Las MAPKKKs presentan un dominio N-terminal regulador y un dominio C-terminal serín/treonín quinasa. Tras su activación, la MAPKKK fosforila dos residuos conservados de serina y treonina en el dominio de activación de la región N-terminal del segundo componente, la MAPK quinasa o MAPKK. Las MAPKKs son proteínas quinasas de especificidad dual (serín/treonín y tirosín quinasas) que, una vez fosforiladas y activadas, fosforilan un residuo de treonina y otro de tirosina localizados en un motivo conservado Thr-X-Tyr del dominio de activación del tercer y último componente de la cascada, la MAPK. Finalmente, la MAPK, que es una serín/treonín quinasa, fosforila a sus sustratos en los motivos Ser/Thr-Pro, permitiendo una respuesta celular adecuada al estímulo desencadenante de la activación del módulo de MAPKs (Chen and Thorner, 2007).

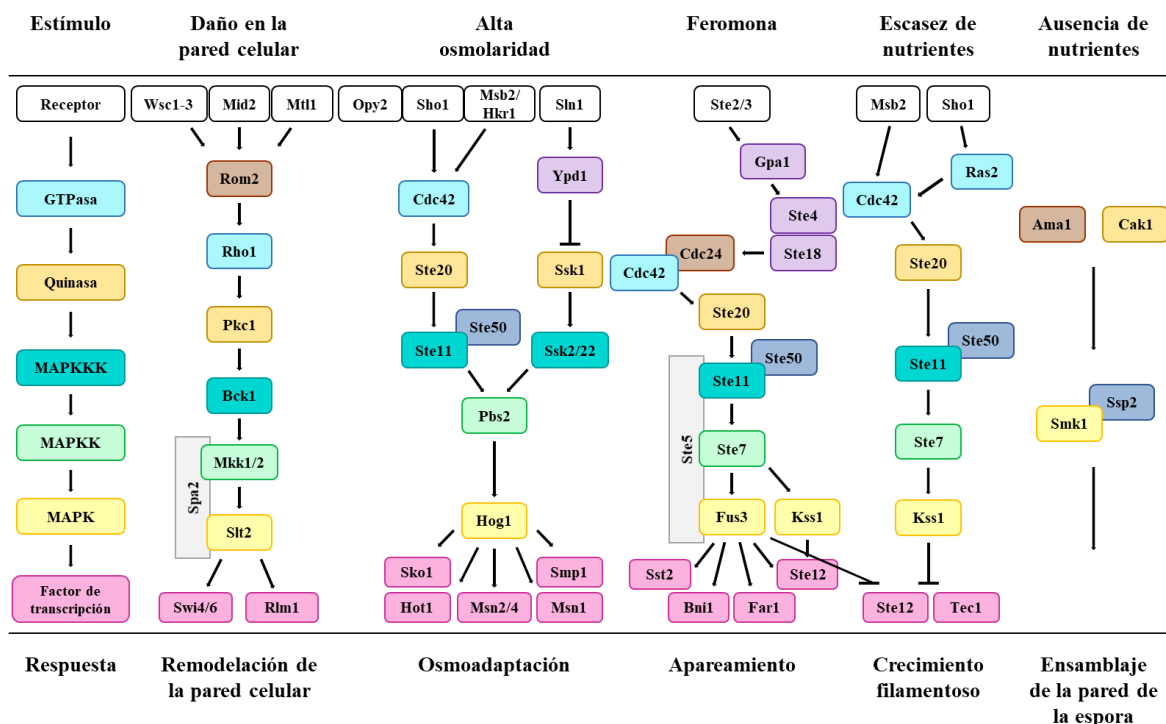


Figura 1. Las diferentes vías de señalización mediadas por MAPKs en la levadura *S. cerevisiae*. Se indican los principales componentes que las integran, así como los estímulos que las activan y las respuestas celulares que se originan.

La levadura *S. cerevisiae* presenta cinco MAPKs en cinco rutas funcionalmente bien diferenciadas (Figura 1). Cuatro de ellas, Fus3, Kss1, Slt2 y Hog1, intervienen

respectivamente en la ruta de apareamiento, la de filamentación y crecimiento invasivo (FIG), la de integridad celular (CWI) y la de alta osmolaridad (HOG), y están presentes en células vegetativas. Kss1 participa también en la ruta de apareamiento, aunque con un papel menor que Fus3. Por el contrario, la MAPK Smk1, que es parte de la ruta de ensamblaje de la pared de la espora, no está presente en células en crecimiento, pero aparece durante la esporulación y regula el desarrollo de este proceso (Martínez-Soto and Ruiz-Herrera, 2017).

2.1. La ruta de crecimiento en alta osmolaridad o ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*)

En la naturaleza, las células de levadura deben enfrentarse a situaciones en las que la osmolaridad externa es mayor que la osmolaridad intracelular, lo que induce la salida de agua del interior celular, la elevación de la concentración de iones citosólicos, y el encogimiento celular por la consecuente disminución de la presión de turgencia (Wood, 2011). Todos estos efectos son perjudiciales para el crecimiento celular, por lo que para contrarrestarlos las células inician un programa adaptativo complejo que incluye la parada temporal del ciclo celular, el ajuste de los patrones de transcripción y traducción, y la síntesis y retención de osmolitos compatibles como el glicerol. Este mecanismo adaptativo encargado del restablecimiento del balance osmótico está mayoritariamente gobernado por la ruta HOG (Figura 2) (Saito and Posas, 2012).

Esta ruta está mediada por la MAPK Hog1, cuyo ortólogo funcional en mamíferos es la MAPK p38, incluida en la familia de MAPKs activadas por estrés (SAPKs) (Han *et al.*, 1994). Tras someter a las células de levadura a un estrés hiperosmótico, se produce la activación de Hog1 por fosforilación en dos residuos conservados de treonina y tirosina presentes en el motivo T-G-Y de su dominio de activación. Esta activación puede darse por dos mecanismos independientes que convergen en la MAPKK Pbs2. Estas dos ramas de la parte superior de la ruta HOG se denominan de acuerdo a los dos osmosensores transmembranales Sln1 y Sho1, que median la activación de la ruta de manera independiente en cada una de las ramas en respuesta a un incremento de la osmolaridad externa (Saito and Posas, 2012; Saito and Tatebayashi, 2004). Mientras que la rama SLN1 participa en la respuesta a incrementos de osmolaridad leves, la rama SHO1 se activa gradualmente con osmolaridades externas más elevadas (O'Rourke and Herskowitz, 2004).

Existen otros estímulos no-osmóticos que activan la ruta HOG, como el estrés por frío y por calor, la hipoxia, la zimoliasa, el arsenito, el ácido acético o la inhibición de la síntesis de

INTRODUCCIÓN

esfingolípidos, entre otros. Sin embargo, en la mayoría de estos casos, Hog1 se activa solo moderadamente y sus cinéticas de fosforilación son distintas a las observadas durante el osmoestrés, y estos estreses normalmente activan a la rama de Sln1 o a la de Sho1, pero no a ambas (Saito and Posas, 2012).

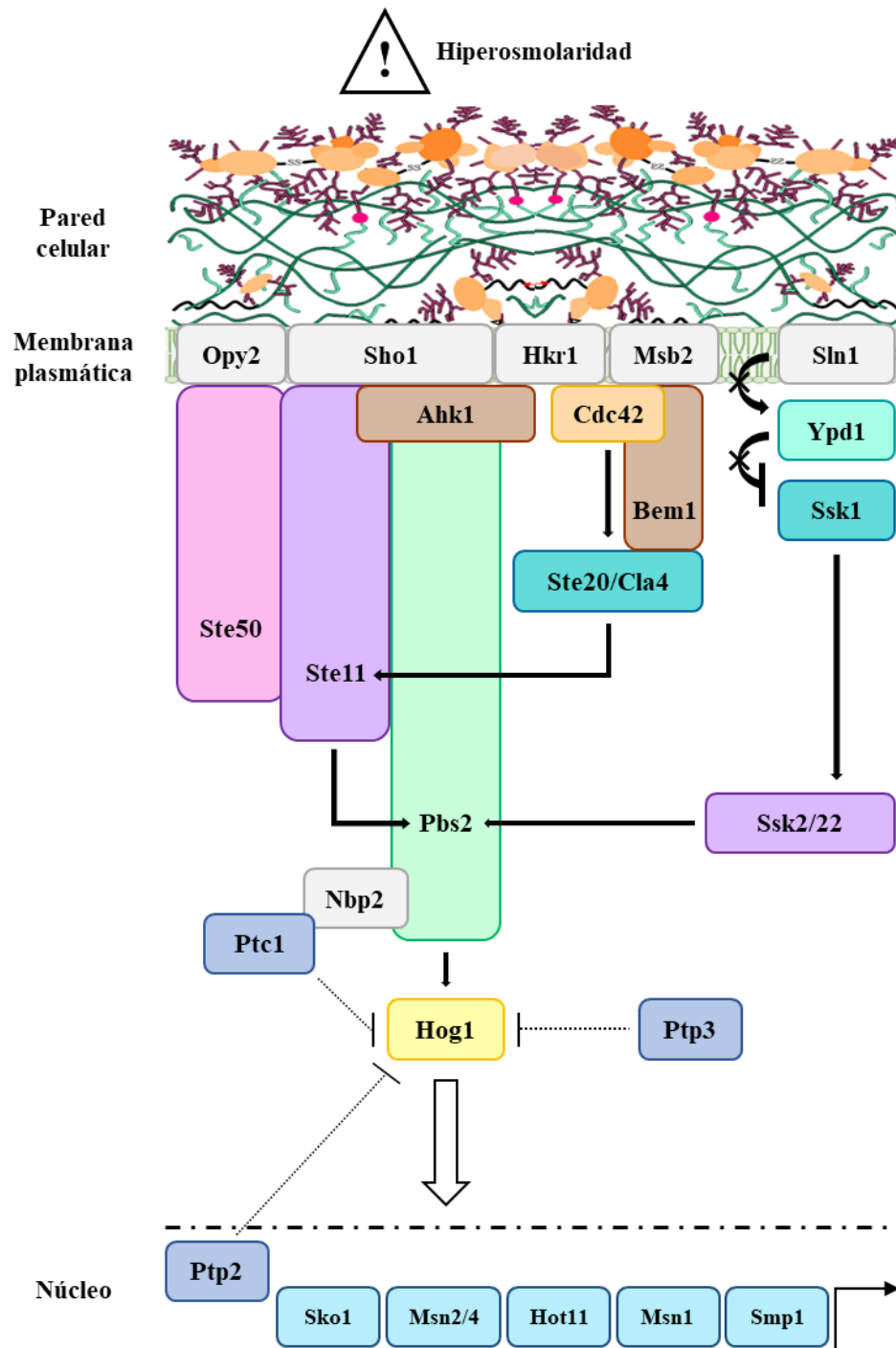


Figura 2. Los principales componentes de la ruta de alta osmolaridad o ruta HOG en *S. cerevisiae*.

2.1.1. La rama SLN1

La rama de Sln1 es similar a los sistemas de señalización de dos componentes propios de procariotas. Se basa en un mecanismo de transferencia de un grupo fosfato desde el osmosensor Sln1 a una proteína intermedia Ypd1 y de esta a la quinasa Ssk1 (Figura 3) (Saito, 2001).

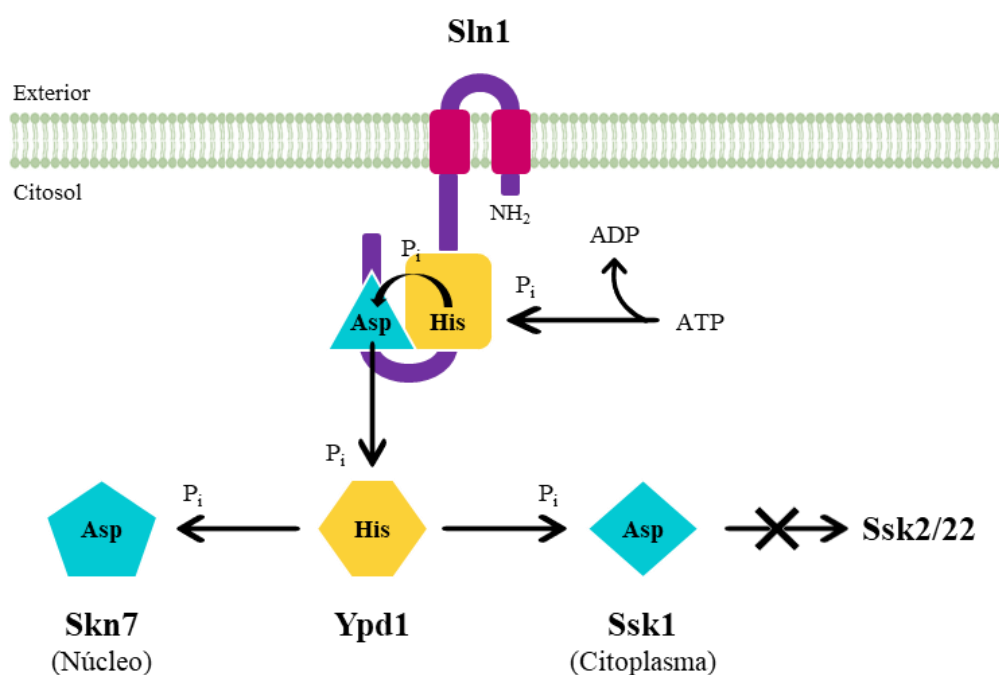


Figura 3. Esquema del sistema de tres componentes de la rama SLN1 de la ruta HOG (adaptada de Gustin *et al.*, 1998).

Sln1 es una proteína politópica con dos segmentos transmembranales que flanquean el dominio sensor extracelular en su mitad N-terminal, y un dominio histidina quinasa (HK) y otro receptor en la parte C-terminal citosólica (Ota and Varshavsky, 1993). En condiciones osmóticas normales, el dominio HK de Sln1 se encuentra en su conformación activa y transfiere un grupo fosfato desde el ATP a un residuo de histidina (His576) cerca de su dominio HK (Posas *et al.*, 1996). El grupo fosfato es después trasladado desde la histidina a un residuo de aspartato (Asp1144) presente en el dominio receptor, que a su vez cederá el fosfato a otra histidina (His64) en la proteína fosfotransferasa Ypd1. Por último, el grupo fosfato es transferido desde la histidina de Ypd1 hasta un residuo de aspartato (Asp554) en el dominio receptor de Ssk1. Ssk1 fosforilada es incapaz de interactuar con las MAPKKKs redundantes Ssk2 y Ssk22, imposibilitando la activación de la cascada de MAPKs (Saito and Posas, 2012). Sin embargo, en ausencia de estimulación externa, existe un nivel basal bajo

de la rama SLN1, lo que podría dar lugar a una respuesta más rápida al osmoestrés (Macia *et al.*, 2009).

En condiciones de hiperosmolaridad, el dominio sensor de Sln1 detecta los cambios en la presión de turgencia (Reiser *et al.*, 2003) y el dominio HK pasa a una conformación inactiva (Fassler and West, 2010), impidiendo la fosforilación secuencial de Sln1-Ypd1-Ssk1. Ssk1 es rápidamente desfosforilada, pudiendo unirse y activar a las proteínas quinasas redundantes Ssk2 y Ssk22 (Posas and Saito, 1998), que activan a su vez a Pbs2 (Maeda *et al.*, 1995). Ssk2/22 presentan un dominio catalítico en el extremo C-terminal y un dominio autoinhibidor en la región N-terminal, al que se une Ssk1 desfosforilada, liberando al dominio catalítico de la inhibición del dominio autoinhibidor y provocando su autofosforilación y activación (Posas and Saito, 1998).

La mutación de cualquiera de estos cuatro aminoácidos conservados His-Asp-His-Asp en estas tres proteínas iniciales de la rama de Sln1 bloquea completamente la regulación negativa de la ruta HOG y da lugar a la hiperactivación de la cascada de MAPKs y a la subsecuente toxicidad. Por tanto, Sln1 e Ypd1 son reguladores negativos de la ruta HOG, y la delección de cualquiera de estos dos genes es letal (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1996). De igual forma, la sobreexpresión de Ssk2/22 sin su dominio regulador N-terminal también induce la hiperactivación de la ruta HOG y la muerte celular (Maeda *et al.*, 1995).

Además de Ssk1, Ypd1 puede transferir el fosfato de su residuo de histidina al aspartato consenso (Asp427) del dominio receptor de Skn7, un factor de transcripción muy conservado en los hongos (Li *et al.*, 1998). Por tanto, Ypd1 debe transitar entre el núcleo y el citoplasma, donde se encuentran Skn7 y Ssk1, respectivamente (Lu *et al.*, 2003). Mientras que Skn7 regula genes de respuesta a estrés oxidativo de manera independiente de Sln1 (He *et al.*, 2009), la fosforilación de Skn7 en el Asp427 por parte de Sln1 parece responder a estrés de pared (Shankarnarayan *et al.*, 2008).

2.1.2. La rama SHO1

La señal de respuesta a estrés hiperosmótico en la rama de Sho1 es iniciada por los osmosensores Msb2 y Hkr1 (Figura 4) (Tanaka *et al.*, 2014; Tatebayashi *et al.*, 2007). Estas dos proteínas poseen un único dominio transmembranal y una larga región extracelular muy rica en Ser/Thr y que contiene numerosos sitios de O-glicosilación. Este dominio altamente glicosilado tiene una función reguladora negativa, pues su delección convierte a estas

proteínas en formas constitutivamente activas (Cullen *et al.*, 2004; Tatebayashi *et al.*, 2007). Además, en la fracción extracelular, ambos osmosensores presentan también un dominio conservado HMH (*Hkr1-Msb2 Homology*) que es esencial para su actividad (Tatebayashi *et al.*, 2007). Por otro lado, tanto Msb2 como Hkr1 interactúan a través de su región citoplasmática con las proteínas adaptadoras Bem1 (Takaku *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2014) y Ahk1 (Nishimura *et al.*, 2016), respectivamente.

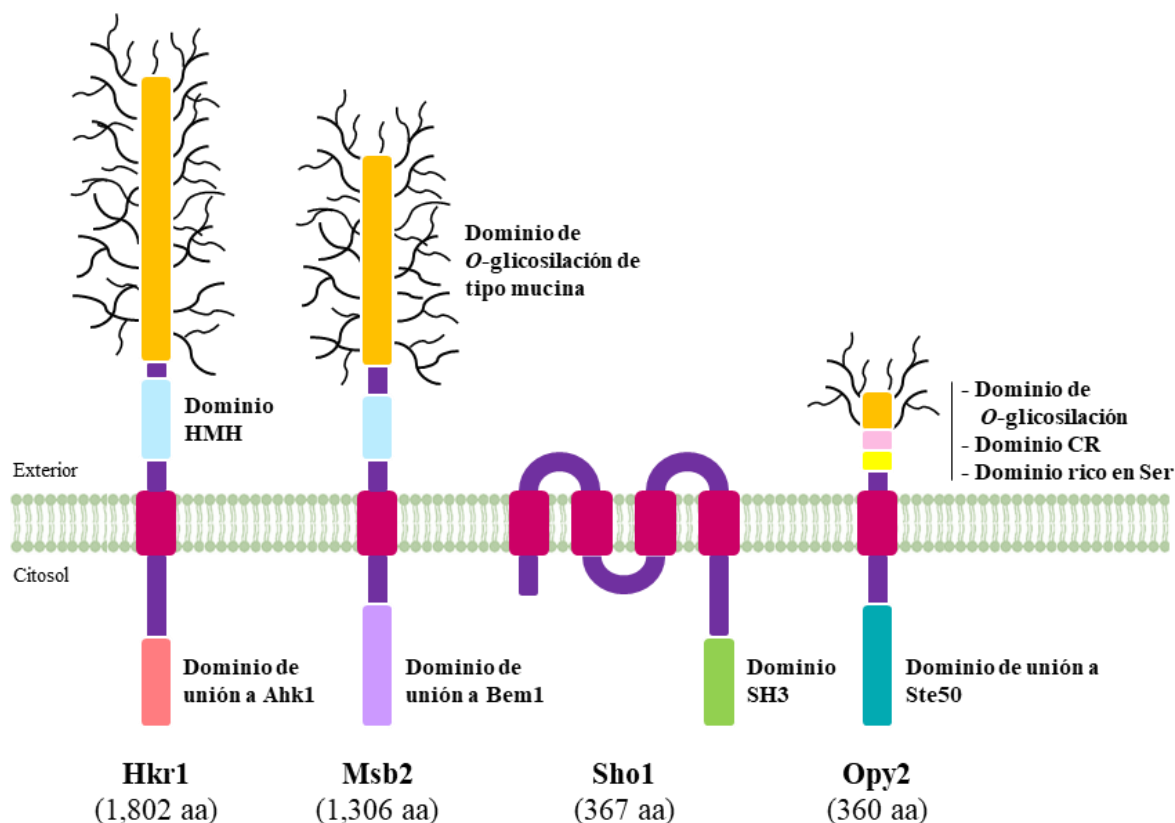


Figura 4. Representación esquemática de las cuatro proteínas transmembranales implicadas en la señalización de la rama SHO1 de la ruta HOG (adaptada de Saito and Posas, 2012).

El osmosensor Sho1 está compuesto por un conjunto de cuatro segmentos transmembranales en el extremo N-terminal, y por un dominio SH3 citoplásmico en el extremo C-terminal (Figura 4), que se une al motivo rico en prolina de la región reguladora N-terminal de Pbs2 y sirve para reclutar a esta MAPKK a la membrana plasmática (Maeda *et al.*, 1995). Esta interacción Sho1-Pbs2 es requerida para la activación de Pbs2 por la MAPKKK Ste11 (Posas and Saito, 1997), que también se une a la cola citosólica C-terminal de Sho1 (Zarrinpar *et al.*, 2004). Tras su activación, Pbs2 se disocia rápidamente de Sho1 por un mecanismo dependiente de su actividad catalítica (Reiser *et al.*, 2000), por lo que la interacción Sho1-Pbs2 podría estar dinámicamente regulada por una retrofosforilación por parte de Pbs2

activada (Saito and Posas, 2012). Se ha sugerido que Sho1, además de actuar como osmosensor (Tatebayashi *et al.*, 2015), podría estar detectando señales relacionadas con la morfología celular o las condiciones de la superficie celular (Hohmann *et al.*, 2007), ya que se localiza específicamente en la membrana plasmática en regiones de crecimiento polarizado (Raitt *et al.*, 2000; Reiser *et al.*, 2000), e independientemente del estrés osmótico (Reiser *et al.*, 2003).

Opy2 es otra proteína con un único dominio transmembranal que posee una región extracelular más corta que la de Msb2 y Hkr1 compuesta, desde el extremo N-terminal, por un dominio muy rico en Ser, un dominio rico en Cys (CR) y otro dominio rico en Ser (Figura 4). El primer dominio rico en Ser es altamente *O*-glicosilado, pero su delección no parece tener ningún efecto observable sobre las funciones de Opy2 (Yang *et al.*, 2009). Esta proteína ejerce una función fundamentalmente estructural en la rama SHO1.

El mecanismo aún por identificar que implica la interacción entre los co-osmosensores Msb2 y Hkr1 y la proteína de anclaje a membrana Opy2 con el osmosensor Sho1 conduce a la activación de las quinasas de tipo PAK (o quinasas activadas por p21) Ste20 y Cla4 mediante la inducción de su asociación con la proteína G pequeña Cdc42 unida a la membrana (O'Rourke and Herskowitz, 1998; Raitt *et al.*, 2000). En ausencia de estímulo, las quinasas de la familia PAK están inhibidas por su dominio autoinhibidor N-terminal que se une al dominio quinasa C-terminal (Lei *et al.*, 2000). Esta autoinhibición se alivia cuando la GTPasa Cdc42 unida a GTP y, por tanto, activa se une al dominio de unión de p21 (CRIB) de las PAK, que está cerca del dominio autoinhibidor (Lamson *et al.*, 2002). Ste20/Cla4 activadas fosforilan los residuos Ser302, Ser306 y Thr307 del dominio regulador N-terminal de Ste11 (Van Drogen *et al.*, 2000), que, una vez activada, fosforila y activa a Pbs2 (Maeda *et al.*, 1995).

La localización membranal de Ste11 está mediada principalmente por la proteína adaptadora Ste50, que forma un complejo estable con Ste11 (Posas *et al.*, 1998) y ayuda a la disociación de los dominios de la MAPKKK inhibidor N-terminal y catalítico C-terminal, aliviando la inhibición de la quinasa (Wu *et al.*, 1999). Por su parte, Ste50 se localiza en la membrana plasmática gracias a su asociación con Opy2 (Ekiel *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2006), Cdc42 (Tatebayashi *et al.*, 2006; Truckses *et al.*, 2006) y Sho1 (Tatebayashi *et al.*, 2015). Al mismo tiempo, la proteína adaptadora Bem1, que interacciona con el osmosensor Msb2, pone en contacto a Cdc42 con Ste20/Cla4 (Takaku *et al.*, 2010), mientras que Ahk1 conecta el

osmosensor Hkr1 con las proteínas Sho1, Ste11 y Pbs2 (Nishimura *et al.*, 2016). Por tanto, el flujo de la señal de estrés osmótico desde los osmosensores por Ste20/Cla4 hacia Ste11 y de ahí a Pbs2 está modulado por una red intrincada de interacciones físicas entre todos los componentes de la parte superior de la rama SHO1.

2.1.3. *Pbs2: elemento de convergencia de las dos ramas de la ruta HOG*

La MAPKK Pbs2 representa un verdadero nodo compartido entre las ramas dependientes de Sln1 y Sho1 para la entrada de la señal en la ruta HOG. Por un lado, el extremo N-terminal de Pbs2 contiene un dominio de unión de gran afinidad por las MAPKKKs Ssk2 y Ssk22 de la rama SLN1 (Tatebayashi *et al.*, 2003) y, en la rama SHO1, Pbs2 se asocia también con Ste11 (Posas and Saito, 1997). Además, Pbs2 se une a su MAPK diana, Hog1, mediante dos motivos de unión específicos de Hog1, uno en la región reguladora N-terminal y otro cerca del extremo C-terminal (Murakami *et al.*, 2008). Por ello, se ha sugerido que Pbs2 tiene la función dual de ser la MAPKK de la ruta HOG y ser la plataforma o el andamio para el ensamblaje correcto de los complejos de señalización necesarios para propagar las señales que ponen en marcha a esta ruta (Chen and Thorner, 2007). La activación de Pbs2 por la acción de una MAPKKK puede ocurrir mediante la fosforilación de la Thr518 de su dominio de activación por Ste11, o por la doble fosforilación de la Ser514 y la Thr518 en este mismo dominio por parte de Ssk2/22. Pbs2 monofosforilada es incapaz de fosforilar a Hog1 a no ser que la reacción entre Pbs2 y Hog1 esté favorecida por osmoestrés (Tatebayashi *et al.*, 2020). Por ende, a diferencia de la rama SLN1, la rama SHO1 tiene un umbral de activación mayor y es incapaz de mediar la máxima activación de la ruta por sí sola (Hohmann *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 1995; O'Rourke and Herskowitz, 2004), lo que supone un mecanismo de prevención de la activación de Hog1 por parte de la actividad basal de las MAPKKKs (Tatebayashi *et al.*, 2020).

En células en reposo, Hog1 se localiza por toda la célula. La activación por fosforilación de Hog1 en las Thr174 y Tyr176 por parte de Pbs2 inducida por estrés osmótico provoca su rápida translocación del citoplasma al núcleo de forma transitoria (Ferrigno *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999). La cinética de localización nuclear de Hog1 se correlaciona con la de la doble fosforilación de Hog1 (Ferrigno *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999), así como con su actividad catalítica (Westfall and Thorner, 2006). El importe nuclear de Hog1 es parcialmente dependiente de la actividad de la GTPasa Gsp1, homóloga a la GTPasa Ran de mamíferos, y de la carioferina Nmd5, homóloga a la importina β (Ferrigno *et al.*, 1998). Tras

la adaptación a la alta osmolaridad o el regreso a unas condiciones osmóticas normales, la exportación nuclear de Hog1 requiere la actividad quinasa de Hog1 (Reiser *et al.*, 1999) y del receptor de señal de exportación nuclear (NES) Xpo1/Crm1 (Ferrigno *et al.*, 1998). Los tiempos de desfosforilación de Hog1 y su salida del núcleo coinciden, pero la desfosforilación en sí no es un requerimiento para la exportación nuclear de Hog1 (Mattison and Ota, 2000).

Por el contrario, Pbs2 se encuentra principalmente en el citoplasma en células no estresadas y estresadas osmóticamente (Ferrigno *et al.*, 1998; Reiser *et al.*, 1999). Presenta una NES cerca de su extremo N-terminal, pero también tiene una señal de localización nuclear (NLS) en el extremo C-terminal (Tatebayashi *et al.*, 2003), lo que sugiere que Pbs2 en realidad transita entre el citoplasma y el núcleo.

2.1.4. Respuesta transcripcional de la ruta HOG

Hog1 tiene funciones citoplasmáticas, como la activación de la quinasa Rck2, una proteína quinasa de la calmodulina que regula la síntesis proteica (Bilsland-Marchesan *et al.*, 2000; Teige *et al.*, 2001), o la modulación del canal de glicerol Fps1 y de las enzimas implicadas en la síntesis de este osmolito (Hohmann, 2015). En el núcleo, esta MAPK regula el ciclo celular al actuar sobre elementos fundamentales para su progresión a través de las diversas fases, y de esta manera permite también a las células adaptarse a las condiciones de estrés hiperosmótico (Clotet and Posas, 2007). Sin embargo, la regulación en el compartimento nuclear de la expresión de cientos de genes en respuesta al choque hiperosmótico (de Nadal *et al.*, 2002) es la función más estudiada y prototípica de Hog1. Se han descrito varios factores de transcripción implicados en la respuesta dependiente de esta MAPK: Hot1, Sko1, Msn2/4, Msn1 y Smp1 (Figura 2), aunque los cuatro primeros son los que juegan un papel más significativo (Hohmann, 2002; Hohmann *et al.*, 2007). Además de regular la actividad de estos factores de transcripción, Hog1 actúa a múltiples niveles sobre muy distintos efectores que influyen en la expresión génica: se asocia a genes de respuesta a estrés para regular el remodelado de la cromatina y la modificación de las histonas, modula el proceso de iniciación transcripcional y la elongación, y participa en el procesamiento del mRNA, en su exportación al núcleo e incluso en el proceso de traducción ya en el citoplasma (De Nadal and Posas, 2015).

Sorprendentemente, el impedimento de la localización nuclear de Hog1, bien mediante su anclaje a la membrana plasmática de manera artificial o eliminando la carioferina Nmd5 requerida para el importe nuclear de la MAPK, o ambas, no hace a las células osmosensibles, a pesar de que estas células no presenten el perfil transcripcional propio del estrés hiperosmótico (Westfall *et al.*, 2008). Esto sugiere que la modulación citoplasmática por parte de Hog1 de las enzimas encargadas de la producción y acumulación de glicerol para hacer frente al desbalance osmótico es más importante para la supervivencia que la alteración del patrón de expresión génica (Bouwman *et al.*, 2011). En cualquier caso, es importante señalar que, gracias a la aplicación de numerosas estrategias proteómicas, el número de posibles sustratos de Hog1 está incrementando de forma muy acusada. Estos resultados sugieren que Hog1 también regula un gran número de proteínas implicadas en la dinámica del citoesqueleto y del huso mitótico, de la red de señalización RAM o de la homeostasis de esfingolípidos (Janschitz *et al.*, 2019; Romanov *et al.*, 2017).

2.1.5. Regulación de la señalización de la ruta HOG

La activación de Hog1 es transitoria y dependiente del nivel de estrés osmótico, pudiendo durar desde unos pocos minutos hasta más de una hora en función de la intensidad del tratamiento osmótico (Hohmann, 2002; Hohmann *et al.*, 2007). Tras el choque hiperosmótico, la fosforilación de los sitios de activación en el motivo T-G-Y de Hog1 se incrementa rápidamente, alcanzando su máximo nivel a los 5 minutos, y después decrece gradualmente hasta niveles cercanos al basal a los 30 minutos (Hao *et al.*, 2007; Maeda *et al.*, 1995). Esta MAPK activa es esencial tanto para la adaptación al estrés hiperosmótico como para la regulación negativa de la ruta HOG, que depende de la actividad quinasa de Hog1 (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997).

Se conocen diversos mecanismos de retroalimentación negativa de la ruta HOG (Vázquez-Ibarra *et al.*, 2020). El más importante es la eliminación de osmoestrés por la acumulación inducida del soluto compatible glicerol, realizada a través de la inducción transcripcional de *GPD1* y de otros genes necesarios para la acumulación de glicerol, y, de forma más inmediata, mediante la regulación directa del canal de glicerol Fps1 y de las actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis de este osmolito (Hohmann, 2015).

Además, como cualquier otra ruta de señalización mediada por MAPKs, la ruta HOG está también regulada negativamente por proteínas fosfatasa. Varios miembros de la familia de

Ser/Thr fosfatasa de tipo 2C (PP2C), Ptc1, Ptc2 y Ptc3, desfosforilan la Thr174 de Hog1. De estas fosfatasa, Ptc1 es la más importante para la inactivación de Hog1 tras la osmoadaptación y para mantener baja su actividad basal, y se localiza tanto en el citosol como en el núcleo (Warmka *et al.*, 2001). La especificidad de Ptc1 sobre Hog1 está indirectamente conferida por la proteína adaptadora Nbp2 (Mapes and Ota, 2004), que se une tanto a Ptc1 como a Pbs2. Por el contrario, Ptc2 y Ptc3 parecen tener un papel más accesorio de limitación de la máxima actividad de Hog1 durante su activación (Young *et al.*, 2002). Paralelamente, las proteínas tirosín fosfatasa Ptp2 y Ptp3 desfosforilan la Tyr176 de Hog1 en el núcleo y en el citoplasma, respectivamente (Jacoby *et al.*, 1997; Mattison and Ota, 2000; Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). A pesar de que estas tirosín fosfatasa son parcialmente redundantes, Ptp2 desfosforila preferentemente a Hog1 y a la MAPK de la ruta CWI, Slt2, mientras que Ptp3 desfosforila más eficientemente a la MAPK Fus3 de la ruta de apareamiento (Mattison *et al.*, 1999; Zhan and Guan, 1999).

2.2. La ruta de integridad de la pared celular o CWI (*Cell Wall Integrity*)

La ruta CWI está principalmente encargada de la preservación de la pared celular, estructura fúngica esencial para la viabilidad celular, mediante mecanismos que regulan su síntesis y remodelación en situaciones que ponen en peligro su integridad.

2.2.1. Función y estructura de la pared celular de S. cerevisiae

La pared celular de la levadura tiene cuatro funciones principales. En primer lugar, proteger frente a los cambios de presión osmótica interna. Segundo, proporcionar protección contra el estrés mecánico. Tercero, mantener la morfología celular, importante para la morfogénesis. Y, por último, la pared celular supone un soporte para el anclaje de distintas proteínas esenciales para procesos celulares clave, como las manoproteínas de la capa externa, que limitan la permeabilidad de la pared celular a las macromoléculas, protegiendo así el esqueleto polisacárido del ataque de proteínas externas, y contribuyen también a la retención de agua (Klis *et al.*, 2006).

La pared celular fúngica está compuesta fundamentalmente por polisacáridos (alrededor de un 85%) y proteínas (15%) (Nguyen *et al.*, 1998). En las células vegetativas, presenta una ultraestructura dispuesta en capas observada mediante microscopía electrónica (Osumi, 1998), con una capa interna polisacáridica de glucanos y quitina, y una capa protectora externa de manoproteínas.

La capa interna de la pared celular está constituida en un 80-90% por β -1,3-glucano, que conforma una red continua tridimensional que confiere a esta estructura elasticidad y resistencia mecánica, y sirve como esqueleto al que están unidos covalentemente otros componentes de la pared, como los polímeros de β -1,6-glucano, que conforman la mayor parte del remanente de la capa interna (8-18%), y la quitina, compuesta por unidades de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) unidas por enlaces β -1,4, que representa la fracción más pequeña (1-2%). En cambio, la capa externa de la pared celular es un entramado de CWPs (*Cell Wall Proteins*) unidas a los polisacáridos de la pared y divididas en dos clases principales, las proteínas con anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI) o GPI-CWPs y las proteínas con repeticiones internas extensamente *O*-manosiladas denominadas Pir-CWPs (Klis *et al.*, 2006; Lesage and Bussey, 2006).

La composición polisacáridica, la estructura y el espesor de la pared varían considerablemente dependiendo de las condiciones ambientales (Aguilar-Uscanga and François, 2003). Igualmente, la célula debe adaptar su pared celular al crecimiento durante la proliferación vegetativa, la morfogénesis inducida por feromonas y la formación de la yema durante la división celular. Por ello, tanto la biogénesis como la reestructuración de esta estructura están fuertemente controladas y estrictamente coordinadas con el ciclo celular (Bähler, 2005; Smits *et al.*, 1999). Entre las proteínas de la superficie celular que están activamente implicadas en la biogénesis de la pared se puede encontrar sintasas, como la β -1,3-glucán sintasa compuesta por las subunidades catalíticas Fks1 y Gsc2/Fks2, o las quitín sintasas CSI, CSII y CSIII y sus subunidades catalíticas respectivas Chs1, Chs2 y Chs3. Además, la remodelación de la pared incluye la rotura de los entrecruzamientos preformados y la incorporación de los polisacáridos de síntesis *de novo* en el núcleo de la pared preexistente, mediante la elongación, ramificación y entrecruzamiento de los mismos por la acción de actividades enzimáticas de transglicosilación (Sanz *et al.*, 2017), como Gas1, que presenta actividad β -1,3-glucán elongasa, Crh1 y Crh2, responsables del acoplamiento de la quitina tanto al β -1,3- como al β -1,6-glucano, o Kre6 y Skn1, implicadas en la biosíntesis del β -1,6-glucano, entre otras enzimas (Orlean, 2012).

A pesar de que varias rutas de señalización contribuyen al mantenimiento de la pared celular, la principal responsable de la regulación de la composición y estructura de la pared es la ruta CWI.

2.2.2. Componentes de la ruta CWI

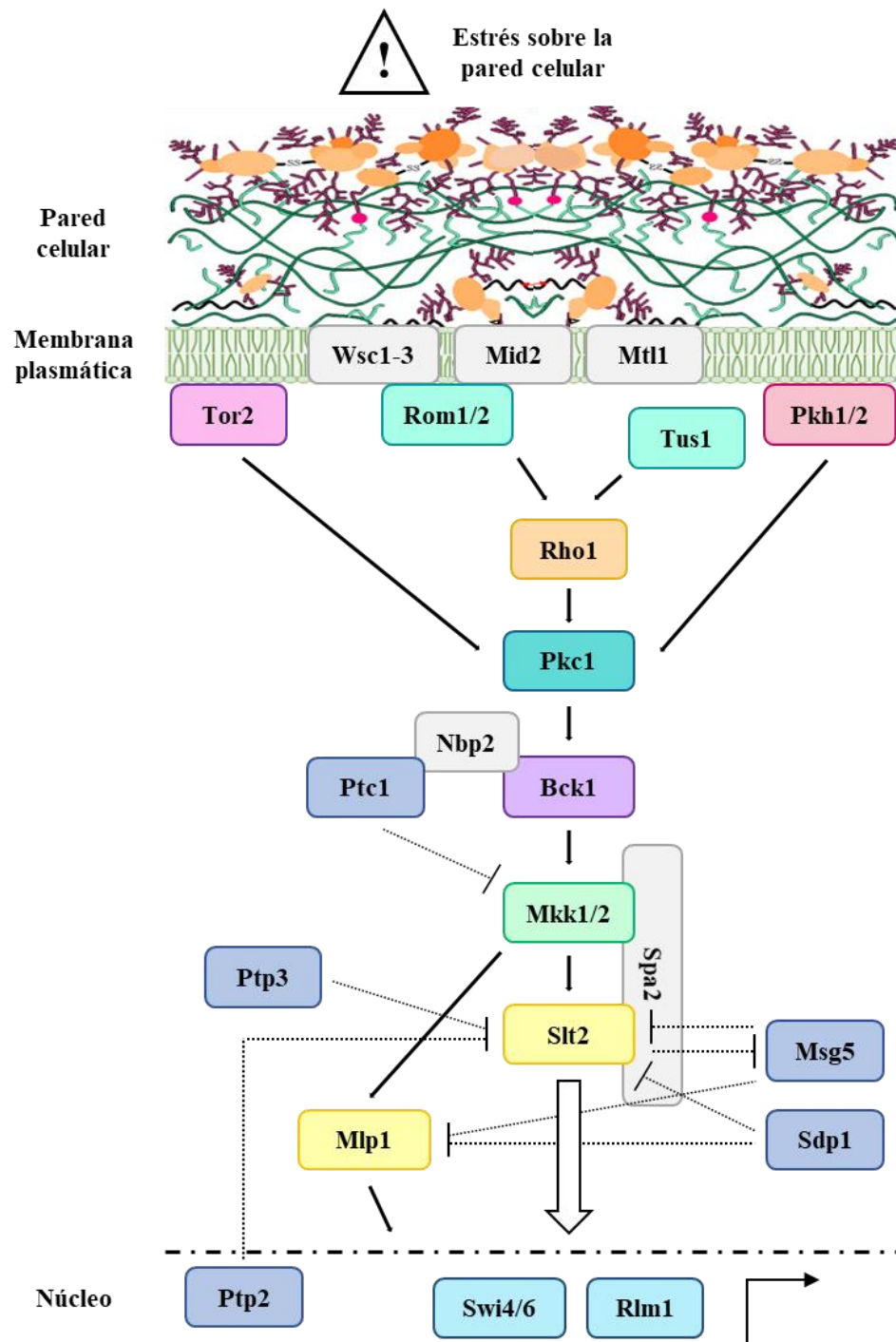


Figura 5. Los principales componentes de la ruta de integridad de la pared celular (CWI) en *S. cerevisiae*.

La ruta CWI (Figura 5) se inicia con un conjunto de mecanosensores presentes en la superficie celular encargados de la detección de los estímulos activadores de la ruta, que transmiten la señal y activan a una serie de proteínas intracelulares que actúan por debajo de estos de manera secuencial. El objetivo final es generar una respuesta transcripcional

mediada por factores de transcripción nucleares que permiten la adaptación y supervivencia celulares frente al estrés que ha puesto en marcha la ruta.

2.2.2.1. Sensores

La ruta CWI de *S. cerevisiae* cuenta con cinco sensores dispuestos en la superficie celular responsables de la detección de perturbaciones en la pared celular y en la membrana plasmática. Estos se pueden dividir en dos subfamilias, los sensores de tipo Wsc, Wsc1, Wsc2 y Wsc3, y los de tipo Mid, Mid2 y Mtl1 (Kock *et al.*, 2015).

A pesar de que su secuencia aminoacídica presenta una baja homología, su estructura terciaria es bastante similar. Se trata de proteínas con un único dominio transmembranal que les ancla a la membrana plasmática, una región larga N-terminal extracelular que se encuentra interaccionando débilmente con algunos elementos de la pared, como los glucanos o las proteínas, y una pequeña cola C-terminal citosólica, implicada en la transmisión de la señal a los siguientes elementos corriente abajo de la ruta tras su activación (Figura 6) (Jendretzki *et al.*, 2011; Rodicio and Heinisch, 2010).

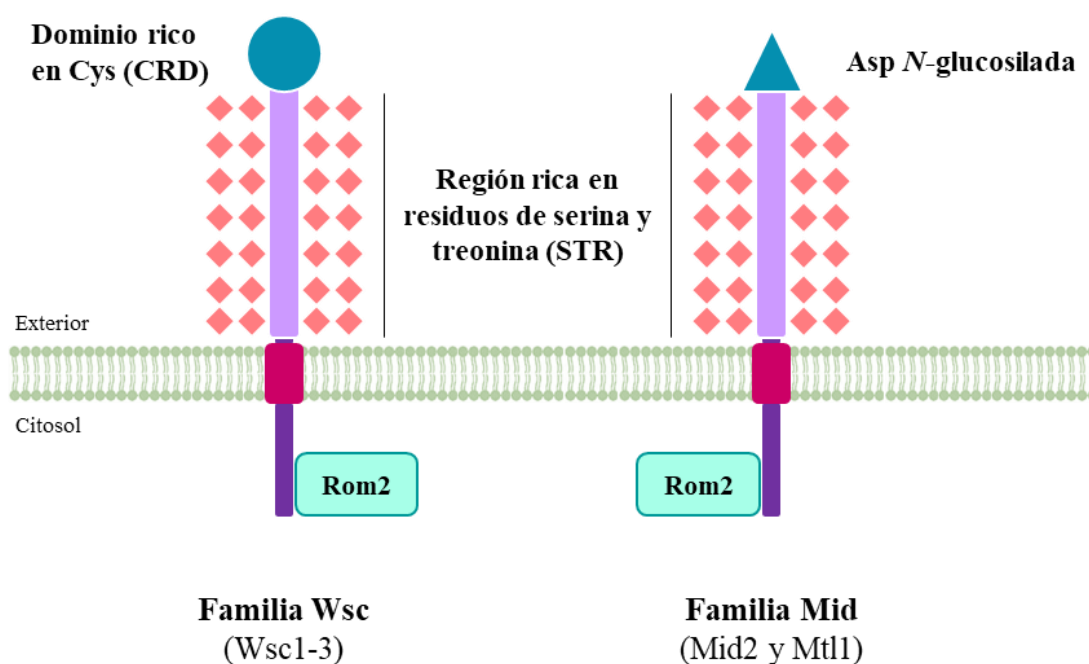


Figura 6. Esquema de las dos familias de mecanosensores de la ruta CWI y sus dominios (adaptada de Jendretzki *et al.*, 2011).

La clasificación de los sensores en dos grupos se basa en el dominio rico en cisteínas denominado CRD o dominio Wsc presente en el extremo extracelular N-terminal de los

sensores de tipo Wsc, y que se encuentra presumiblemente interaccionando con el glucano de la pared (Kock *et al.*, 2015). En cambio, tanto Mid2 como Mtl1 carecen de este dominio CRD, pero presentan un residuo conservado de asparagina *N*-glicosilado cerca de su extremo N-terminal que, de forma similar al dominio CRD, podría estar en contacto con los glucanos o las manoproteínas de la pared (Hutzler *et al.*, 2008).

Asimismo, la fracción extracelular de estos sensores contiene también una región común rica en residuos de serina y treonina (STR) que está altamente *O*-manosilada (Lommel *et al.*, 2004; Philip and Levin, 2001), lo que confiere rigidez a estas proteínas y un comportamiento mecánico similar a un “nanomuelle”, capaz de resistir fuerzas mecánicas elevadas. Por este motivo, a estos sensores se les denomina “mecanosensores” (Alsteens *et al.*, 2012; Dupres *et al.*, 2009).

Por otro lado, ambos tipos de sensores reclutan por interacción directa con su dominio citoplasmático a la GEF de Rho1 Rom2 a los sitios cercanos a la superficie celular donde se precisa la remodelación de la pared celular (Petkova *et al.*, 2012; Philip and Levin, 2001). Además, Wsc1 y Mid2 también son capaces de interaccionar con Ras2 (Santiago-Cartagena *et al.*, 2019; Vélez-Segarra *et al.*, 2019). En el caso de Mid2, su interacción con Rom2 está mediada por otra proteína, Zeo1 (Green *et al.*, 2003).

Así, tanto una perturbación de la pared celular como el estrechamiento de la membrana plasmática estarían generando una fuerza mecánica sobre la parte extracelular del sensor que se transmite a la cola citoplasmática, promoviendo su interacción con los componentes de señalización intracelulares corriente abajo y dando lugar, finalmente, a la respuesta transcripcional adecuada al tipo de estímulo iniciador de la ruta (Jendretzki *et al.*, 2011).

Cada sensor ocupa un microdominio específico en la membrana plasmática (Kock *et al.*, 2016). Por un lado, y de manera dependiente del dominio CRD, Wsc1 forma agrupaciones en la membrana plasmática de forma polarizada, que se incrementan en número y tamaño en condiciones de estimulación de la señalización de la ruta CWI (Heinisch *et al.*, 2010a). Estos agrupamientos o “sensosomas” establecen un umbral para la generación de la señalización intracelular (Heinisch *et al.*, 2010b; Rodicio and Heinisch, 2010), y se encuentran en unos compartimentos en la membrana denominados MCW (*Membrane Compartment occupied by Wsc1*), donde también se puede encontrar a Wsc2 y, en menor medida, a Wsc3. La agrupación de los sensores es importante tanto para la activación de la ruta CWI como para

protegerlos de la endocitosis (Kock *et al.*, 2016), lo que, a su vez, asegura la localización polarizada de los sensores evitando la difusión lateral en la membrana plasmática (Piao *et al.*, 2007; Wilk *et al.*, 2010).

Al contrario que los sensores de la familia Wsc, Mid2 no forma agrupamientos y parece estar más ampliamente distribuida por la membrana, formando una estructura parecida a una red, de manera más estática, ya que su localización no se ve afectada por situaciones de estrés de pared (Alsteens *et al.*, 2012; Spira *et al.*, 2012; Straede and Heinisch, 2007). Únicamente, tras la estimulación con feromona, Mid2 se acumula en la punta de la *shmoo*, estructura propia del proceso de apareamiento (Hutzler *et al.*, 2008). De hecho, se ha determinado que esta proteína es esencial para el proceso de apareamiento, y los mutantes carentes de este sensor son hipersensibles al tratamiento con feromona (Ono *et al.*, 1994).

Por otro lado, Mtl1 se localiza en la periferia celular, en la yema y en el septo de las células en crecimiento, y en la punta del *shmoo* en presencia de feromona, y su distribución en estas dos últimas localizaciones requiere la *O*-manosilación del sensor (Petkova *et al.*, 2012). Mtl1 activa a la ruta CWI en respuesta a la falta de glucosa y al estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno, al mismo tiempo que regula negativamente las funciones de Tor1 y Ras2 a través de Rom2-Rho1 (Petkova *et al.*, 2010; Vilella *et al.*, 2005).

El mutante *wsc1Δ* muestra fenotipos de sensibilidad frente a distintos estreses de pared similares a los de mutantes defectivos en otros componentes de la ruta (Gray *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998; Verna *et al.*, 1997). En cambio, la falta de Wsc2, Wsc3 o de ambos no causa fenotipos drásticos, aunque los mutantes carentes de Wsc2 muestran un *fitness* competitivo reducido (Wilk *et al.*, 2010). Sin embargo, la delección de *WSC2* y *WSC3* en un mutante *wsc1Δ* potencia los defectos de crecimiento y sensibilidades de la delección simple, sugiriendo funciones solapantes dentro de la familia de sensores de tipo Wsc (Verna *et al.*, 1997).

En contraste con la mayoría de los mutantes de la ruta CWI, una delección simple de *MID2* no produce hipersensibilidad sino hiperresistencia al agente de unión a quitina blanco de calcoflúor (CFW) (Ketela *et al.*, 1999). La resistencia a CFW ha sido atribuida a la síntesis reducida de quitina, lo que sugiere que Mid2 induce la actividad de la quitín sintasa bajo condiciones de estrés en células silvestres. Esto ha sido respaldado por los datos transcriptómicos de la respuesta específica mediada por este sensor, ya que la respuesta

transcripcional a otro agente de unión a quitina, rojo Congo (RC), está principalmente señalizada por Mid2 (Bermejo *et al.*, 2010). Por el contrario, la respuesta inducida por el inhibidor de la β -1,3-glucán sintasa caspofungina, un miembro de la familia de antifúngicos equinocandinas, ha sido atribuida únicamente a la señalización por Wsc1 (Bermejo *et al.*, 2010), ya que este compuesto es un inhibidor común de la familia de sensores Wsc (Vélez-Segarra *et al.*, 2019). La detección por Wsc1 del daño causado por la caspofungina induce, al mismo tiempo, la activación de la ruta CWI y la inhibición de la ruta de la proteína quinasa A (PKA) mediada por Ras2 (García *et al.*, 2017).

Por último, el mutante doble *wsc1 Δ mid2 Δ* es sintético letal (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999), probablemente por un solapamiento funcional de estos dos sensores en el mantenimiento de la integridad celular.

2.2.2.2. Rho1

En *S. cerevisiae* existen seis proteínas G pequeñas pertenecientes a la familia de GTPasas de tipo Rho (*Ras-homologous*), Rho1-5 y Cdc42 (Perez and Rincón, 2010). Cumplen distintas funciones relacionadas con el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. De estas GTPasas, Rho1, homólogo funcional de RhoA en mamíferos (Qadota *et al.*, 1994), asegura la integridad celular, principalmente a través de la activación de la ruta CWI (Levin, 2011), y es el componente activador del complejo β -1,3-glucán sintasa (Cabib *et al.*, 1998; Qadota *et al.*, 1996), entre otras funciones. La correcta localización y función de Rho1 reside en su unión a la membrana plasmática a través de la prenilación de su extremo C-terminal (Inoue *et al.*, 1999). Además, posee una secuencia polibásica cerca del extremo C-terminal que interacciona con los fosfatos cargados negativamente de los fosfolípidos ácidos de membrana, como el fosfatidilinositol (PI)-4,5-bisfosfato (PIP₂), y es importante para la localización de Rho1 en regiones específicas de la membrana plasmática (Yoshida *et al.*, 2009). Rho1 se encuentra predominantemente en las zonas de crecimiento, como el sitio de gemación incipiente, la punta de la yema y el cuello de la yema antes de la citocinesis (Yamochi *et al.*, 1994).

El cambio de GDP por GTP, y, por tanto, la activación de Rho1, está controlado por las proteínas GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), que interaccionan con esta GTPasa y alteran el sitio de unión a GDP, facilitando su liberación. Las GEFs Rom1, Rom2 y Tus1 ejercen funciones solapantes en la activación de Rho1 en la ruta de integridad celular (Ozaki

et al., 1996; Schmelzle *et al.*, 2002). La pérdida de función de los genes *ROM2* o *TUS1* se traduce en termosensibilidad, mientras que la mutación *rom1Δ rom2Δ* es sintética letal (Ozaki *et al.*, 1996; Schmelzle *et al.*, 2002). Además, Tus1 es la GEF principalmente responsable de la activación específica de ciclo celular de Rho1 (Kono *et al.*, 2008) y en la homeostasis de la fluidez de la membrana (Lockshon *et al.*, 2012). Al igual que Rho1, sus GEFs residen en los sitios de crecimiento polarizado de manera dependiente del citoesqueleto de actina (Kono *et al.*, 2008; Manning *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 2006). Poseen dominios de homología de pleckstrina (PH), que, en el caso de Rom1 y Rom2, pero no de Tus1, unen PIP₂ y son responsables de su correcta localización en la membrana plasmática (Audhya and Emr, 2002; Yu *et al.*, 2004).

Como se ha comentado anteriormente, los sensores junto con el PIP₂ colaboran para reclutar a las GEFs a la membrana plasmática y focalizar su acción en los sitios de crecimiento polarizado (Philip and Levin, 2001), en los que se ha visto un enriquecimiento en este fosfolípido (Garrenton *et al.*, 2010). Por tanto, los fosfoinosítidos juegan un papel importante en la activación de Rho1 y en el reclutamiento de algunos de sus efectores a la membrana plasmática y a los sitios de remodelación de la pared celular.

Para la regulación negativa, cuatro GAPs (*GTPase Activating Protein*) actúan sobre Rho1 en *S. cerevisiae*, Bem2, Sac7, Bag7 y Lrg1 (Levin, 2011). Por un lado, Lrg1 es el principal regulador negativo de la función activadora de la β -1,3-glucán sintasa de Rho1 (Watanabe *et al.*, 2001). En cambio, Bem2 y Sac7 contribuyen a la modulación negativa de la ruta CWI (Martín *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2002), mientras que Bag7 y Sac7 controlan la organización del citoesqueleto de actina (Schmidt *et al.*, 1997, 2002). Además, Rho1 está regulada negativamente también por la GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*) Rdi1, que extrae a Rho1 de la membrana plasmática (Masuda *et al.*, 1994).

2.2.2.3. Pkc1

En *S. cerevisiae*, *PKC1* es el único homólogo de la proteína quinasa C de mamíferos (Levin *et al.*, 1990). Se trata de un gen esencial, aunque los defectos en el crecimiento del mutante *pkc1Δ* pueden contrarrestarse mediante la adición al medio de sorbitol 1M como soporte osmótico (Levin and Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini *et al.*, 1992). El hecho de que la falta de Pkc1 provoque defectos en el crecimiento más graves que los que presentan los mutantes defectivos en cualquiera de los miembros de la cascada de MAPKs bajo su control

INTRODUCCIÓN

sugiere la participación de Pkc1 en otras vías de señalización además de la ruta CWI (Lee and Levin, 1992). Así, se ha implicado a esta quinasa en el control de procesos muy diversos, como la organización del citoesqueleto de actina, la autofagia y la apoptosis, la detección de nutrientes y la biogénesis ribosomal, el ciclo celular, la citoquinesis y la estabilidad genética (Heinisch and Rodicio, 2018).

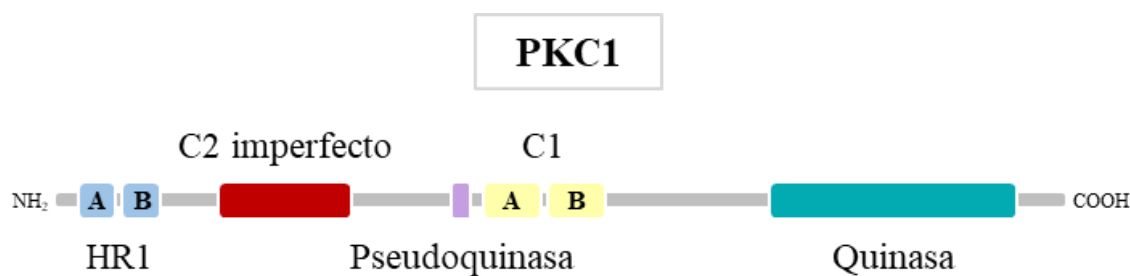


Figura 7. Esquema de los diferentes dominios de Pkc1 en *S. cerevisiae* (adaptada de Heinisch and Rodicio, 2018).

Pkc1 es activada tras su asociación con Rho1-GTP (Kamada *et al.*, 1996; Nonaka *et al.*, 1995) a través de dos regiones del dominio regulador N-terminal de Pkc1, el dominio C1 rico en Cys y el dominio HR1 (*Homology Region 1*) (Figura 7) (Nonaka *et al.*, 1995; Schmitz *et al.*, 2002). A diferencia de las PKCs convencionales, ni el Ca²⁺ ni el diacilglicerol (DAG) son esenciales para la actividad de Pkc1 (Antonsson *et al.*, 1994; Kamada *et al.*, 1996), sino que es la fosfatidilserina (PS) la que actúa como cofactor estimulando su actividad quinasa (Dey *et al.*, 2017; Kamada *et al.*, 1996). El dominio C1 es el encargado de reconocer a la PS de la cara citosólica de la membrana plasmática, regulando de esta manera la localización celular de Pkc1, así como su interacción física con Rho1, necesaria para su activación (Heinisch, 2005; Nomura *et al.*, 2017). Pkc1 presenta también entre los dominios HR1 y C1 un dominio C2 imperfecto, al que le faltan los residuos responsables de la unión al Ca²⁺ (Mellor and Parker, 1998), y un sitio pseudosustrato autoinhibidor inmediatamente antes del dominio C1 (Figura 7) (Newton, 1995). Este sitio pseudosustrato se parece al sitio de fosforilación a excepción de que tiene una alanina en la posición en la que estaría la serina o treonina diana de la fosforilación, y, en condiciones en las que la PKC no está activa, el sitio pseudosustrato inhibe la actividad quinasa por interacción intramolecular con el sitio activo.

Pkc1 es también diana de las Ser/Thr quinasas Pkh1 y Pkh2 (Friant *et al.*, 2001; Inagaki *et al.*, 1999), que fosforilan la Thr983 presente en el bucle de activación dentro del dominio

catalítico de Pkc1, y su función es necesaria para la completa activación de Pkc1. Pkh1/2 son homólogas de la PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase 1*) de mamíferos, y se encuentran asociadas a los eisosomas de la membrana plasmática a través de Pil1 y Lsp1 (Walther *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2004) e interaccionando directamente con el PIP₂ (Gallego *et al.*, 2010). Estas quinasas fosforilan también en el bucle de activación y confieren actividad basal a las quinasas Ypk1 e Ypk2/Ykr2 (Casamayor *et al.*, 1999; Roelants *et al.*, 2002, 2004), que están implicadas en diversos procesos celulares, como el metabolismo de esfingolípidos, el mantenimiento de la asimetría de aminoglicofosfolípidos en la bicapa de la membrana plasmática o la endocitosis de las proteínas de membrana (Roelants *et al.*, 2017). Se ha descrito que Ypk1 parece tener un papel más importante que Ypk2, y que Pkh1 fosforila preferentemente a Ypk1, mientras que Pkh2 prioriza a Ypk2 (Roelants *et al.*, 2002). Esta ruta de señalización actúa en paralelo a la ruta CWI, coordinando la síntesis de membrana plasmática con la expansión de la pared celular.

En determinadas condiciones de estrés, Ypk1/2 son fosforiladas además en su extremo C-terminal por la quinasa Tor2 del complejo TORC2 (*Target of Rapamycin Complex 2*) (Roelants *et al.*, 2017), encargado del mantenimiento de la homeostasis de los lípidos y proteínas de la membrana plasmática y del correcto ensamblaje y funcionamiento del citoesqueleto de actina (Bartlett and Kim, 2014; Gaubitz *et al.*, 2016; Roelants *et al.*, 2017). Esta fosforilación por parte de Tor2 es necesaria para la máxima actividad catalítica de Ypk1/2 (Leskoske *et al.*, 2017), y es dependiente del reclutamiento a la membrana plasmática de estas quinasas por la subunidad Avo1 del complejo TORC2 (Liao and Chen, 2012), que también es la responsable de la localización membranal del complejo (Berchtold and Walther, 2009), y por las proteínas redundantes con dominios PH de unión a PIP₂ Slm1 y Slm2 (Berchtold *et al.*, 2012; Niles *et al.*, 2012), que son a su vez sustratos de TORC2 (Audhya *et al.*, 2004; Fadri *et al.*, 2005) y de la calcineurina (Bultynck *et al.*, 2006; Mulet *et al.*, 2006; Tabuchi *et al.*, 2006).

Tor2 también es la responsable de la activación de Pkc1 por fosforilación en los residuos Thr1125 y Ser1143 situados en dos dominios conservados de su extremo C-terminal (Nomura and Inoue, 2015). Además, la señalización TORC2-Ypk1 regula la actividad de Pkc1 a través de la correcta localización en la membrana plasmática de Rom2 y Rho1 (Hatakeyama *et al.*, 2017; Niles and Powers, 2014). Paralelamente, la ruta CWI modula negativamente este eje TORC2-Ypk1 mediante la fosforilación dependiente de Slt2 de la

subunidad de TORC2 Avo2 inducida por la activación de la ruta de integridad, lo que altera la localización subcelular del complejo (Leskoske *et al.*, 2018), mientras que Pkc1 regula los niveles proteicos de Ypk1 (Zhang *et al.*, 2004). Estas evidencias sugieren la intervención conjunta de ambas rutas en la respuesta frente al estrés de superficie celular.

Pkc1 se localiza intracelularmente en los sitios de crecimiento polarizado (Andrews and Stark, 2000). En las fases G1 y S, Pkc1 presenta un patrón muy similar al de Rho1, ya que reside en el sitio de pre-gemación y en la punta de la yema. Durante la fase G2, se deslocaliza y se relocaliza finalmente en el cuello de la yema durante la mitosis (Denis and Cyert, 2005). Cada subdominio regulador de Pkc1 es responsable de la localización de esta quinasa en los sitios subcelulares específicos. Por ejemplo, los dominios de unión a Rho1, HR1 y C1, son los responsables del reclutamiento de Pkc1 en la punta de la yema y en la periferia. La actividad quinasa de Pkc1 y la integridad del anillo de septinas son necesarias para su localización en el cuello de la yema. A pesar de que Pkc1 contiene varias señales de importe nuclear, la señal de exporte nuclear en el dominio HR1 es la responsable de mantener bajos los niveles de Pkc1 en el núcleo (Denis and Cyert, 2005).

2.2.2.4. Módulo de MAPKs

La señalización entra al módulo de MAPKs a través de Pkc1, que fosforila a la MAPKKK de la ruta Bck1 en una región bisagra entre sus dominios regulador y catalítico (Levin *et al.*, 1994). Bck1, a su vez, fosforila y activa a dos MAPKKs redundantes, Mkk1 y Mkk2 (Irie *et al.*, 1993). A continuación, Mkk1/2 interaccionan con la MAPK Slt2 (Soler *et al.*, 1995) y la fosforilan en dos residuos conservados del bucle de activación, la Thr190 y la Tyr192 (Lee *et al.*, 1993), separados por un residuo de Glu. A pesar de ser funcionalmente redundantes, Mkk1 tiene un papel dominante frente a Mkk2 en la transmisión de la señal hacia Slt2 (Martín *et al.*, 2000; Tatjer *et al.*, 2016). De hecho, la sobreexpresión de un alelo hiperactivo de Mkk1 (*MKK1^{S386P}*) provoca la muerte celular, lo que indica que una hiperactivación de la ruta CWI de forma constitutiva es letal (Watanabe *et al.*, 1995).

La falta de cualquiera de los componentes de la cascada de MAPKs induce la muerte celular por lisis en condiciones de estrés de pared, pero el defecto de estos mutantes en esta estructura se puede remediar mediante estabilización osmótica (Levin, 2011).

Además, *S. cerevisiae* posee una pseudoquinasa paróloga a Slt2, denominada Mlp1 (Watanabe *et al.*, 1997), que comparte con esta MAPK una función transcripcional no

catalítica (Sanz *et al.*, 2017). En Mlp1, la Thr equivalente al sitio de fosforilación dual de Slt2 está cambiada por Lys, pero el residuo de Tyr también es fosforilado por las MAPKKs de la ruta (Kim *et al.*, 2008).

La localización de Slt2 en ausencia de estrés es predominantemente nuclear, mientras que Mkk1/2 se encuentran principalmente en el citoplasma, pero tanto Mkk1/2 como Slt2, a diferencia de Bck1, pueden detectarse en zonas de crecimiento polarizado de manera dependiente de Spa2 (Van Drogen and Peter, 2002), un componente del complejo proteico denominado polarisoma que pone en contacto a los elementos implicados en el establecimiento de la polaridad con el citoesqueleto de actina (Shih *et al.*, 2005). Se ha sugerido una función de andamiaje de Spa2 en la ruta CWI, ya que interacciona al mismo tiempo con Slt2 como con Mkk1/2 (Sheu *et al.*, 1998).

2.2.2.5. Respuesta transcripcional de la ruta CWI

La comparación de las respuestas transcripcionales bajo distintas condiciones de estrés de pared, que incluyen la inducción de 100-200 genes aproximadamente, revela la existencia de perfiles transcripcionales tanto comunes como específicos de cada tipo de estrés (Sanz *et al.*, 2017). De hecho, se considera que el grupo de genes inducidos en casi todas las condiciones constituye la “huella transcripcional” del estrés de pared, que comprende principalmente la inducción de genes relacionados con la biogénesis y la remodelación de la pared celular, el metabolismo y la generación de energía, la morfogénesis, la transducción de señales y el estrés general (Arroyo *et al.*, 2009).

El factor de transcripción Rlm1 es el principal responsable del programa transcripcional de la señalización de la ruta CWI (García *et al.*, 2004). Este factor de transcripción pertenece a la familia de reguladores transcripcionales de caja MADS (*MCMI*, *Agamous*, *Deficiens*, *Serum response factor*), cuyo dominio N-terminal de unión a DNA presenta una especificidad de unión muy parecida a la de la familia de factores de transcripción de mamíferos MEF2 (Dodou and Treisman, 1997). Entre los genes regulados por Rlm1 están los genes codificantes de la glucán sintasa *FKS1* y *FKS2*, genes implicados en la síntesis de quitina, como *GFA1* y *CHS3*, los genes que codifican las Pir-CWPs *PIR1*, *HSP150*, *PIR3* y *CIS3*, los genes de las transglicosidasas *BGL2*, *CRH1* y *DFG5*, los genes que codifican una aspartil proteasa *PST1* e *YPS3*, y los genes de la ruta CWI *SLT2*, *MLP1* y *RLM1* (Sanz *et al.*, 2017).

Rlm1 es constitutivamente nuclear, y su actividad transcripcional se inicia tras la fosforilación por parte de Slt2 de dos residuos, Ser427 y Thr439, dentro de su dominio de activación transcripcional (Jung *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 1997), así como de otros residuos adicionales (Sanz *et al.*, 2018). Para que Slt2 fosforile a Rlm1, es necesaria la interacción de su dominio quinasa doblemente fosforilado en el motivo T-E-Y con la chaperona Hsp90 y la co-chaperona Cdc37 fosforilada (Hawle *et al.*, 2007; Millson *et al.*, 2005). A continuación, la unión del factor de transcripción fosforilado a los promotores de los genes dependientes de Rlm1 y el ensamblaje de la maquinaria de iniciación de la transcripción requiere la remodelación completa del nucleosoma de estos promotores, que se produce gracias a la cooperación entre el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF y el complejo SAGA (Sanz *et al.*, 2012, 2016). Al igual que Rlm1, Slt2 se asocia también al DNA en las regiones promotoras de los genes regulados por Rlm1 de manera dependiente de este factor de transcripción, donde recluta a la RNA polimerasa II para iniciar la transcripción, independientemente de su actividad quinasa (Sanz *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha visto que Slt2 fosforila a las Tyr1 de los hexapéptidos repetidos del dominio C-terminal de la RNA polimerasa II en condiciones de estrés de pared (Yurko *et al.*, 2017). Además, Slt2 participa también en el proceso de elongación de la transcripción de estos genes (Sanz *et al.*, 2018).

Un segundo factor de transcripción implicado en la señalización de la ruta CWI es el complejo SBF (SCB (*Swi4/Swi6-dependent Cell cycle Box*) *Binding Factor*), un regulador dimérico de transcripción G1-específica compuesto por Swi4 y Swi6 (Breedon, 2003). Swi4 es la subunidad de unión específica al DNA (Taylor *et al.*, 2000), mientras que Swi6 es el componente activador transcripcional de SBF (Sedgwick *et al.*, 1998) y la subunidad responsable de la unión del factor de transcripción a los promotores de los genes regulados por el ciclo celular. Swi6 permite la unión al DNA de Swi4 mediante la liberación de su dominio de unión a DNA que se encuentra autoinhibido por su asociación intramolecular al extremo C-terminal (Baetz and Andrews, 1999).

SBF regula la expresión de un pequeño conjunto de genes de la ruta CWI (Kim and Levin, 2010), entre los que se encuentra *FKS2*, de manera independiente de su papel en la transcripción específica de G1 (Kim *et al.*, 2008; Truman *et al.*, 2009). Slt2 y Mlp1 activan a SBF a través de un mecanismo no-catalítico, que requiere la conformación fosforilada y, por tanto, activa de Slt2 y Mlp1 (Kim and Levin, 2010, 2011; Kim *et al.*, 2008). Las formas

activas de Slt2 o Mlp1 forman un complejo con Swi4 (Baetz *et al.*, 2001), que se asocia a los sitios de unión de SBF en los promotores de los genes diana del estrés de pared independientemente de Swi6 (Kim *et al.*, 2008). En este contexto, en lugar de Swi6, es Slt2 la que elimina la interacción autoinhibidora de Swi4 mediante su unión a una región adyacente al sitio de unión de Swi6 en el extremo C-terminal (Truman *et al.*, 2009). Sin embargo, Swi6 debe ser reclutado igualmente al complejo Slt2-Swi4 para permitir la activación transcripcional, formando así un complejo trimérico Slt2-Swi4-Swi6 en el promotor de los genes diana (Kim *et al.*, 2008). Este complejo recluta al complejo Paf1C asociado a la RNA polimerasa II a estos promotores para el inicio de la transcripción y la posterior elongación, en la que ya no participan Swi4-Swi6 (Kim and Levin, 2011).

La fosforilación de Swi6 por parte de Slt2 (Madden *et al.*, 1997) impide la función de una NLS adyacente, lo que provoca la relocalización de Swi6 del núcleo al citoplasma (Kim *et al.*, 2010), que también sufre un tránsito núcleo-citoplasmático regulado por el ciclo celular (Sidorova *et al.*, 1995).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que las funciones de la ruta CWI y las consecuencias de su activación se extienden más allá de su participación en la respuesta transcripcional. Aparte de los factores de transcripción Rlm1 y SBF, se han identificado una amplia diversidad de sustratos de Slt2, como la proteína de silenciamiento Sir3 (Ai *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2003), el componente fundamental de los eisosomas Pil1 (Mascaraque *et al.*, 2013), la subunidad de PKA Bcy1 (Soulard *et al.*, 2010), los reguladores de ciclo celular Sic1 (Moreno-Torres *et al.*, 2015) y la ciclina C (Jin *et al.*, 2014), la proteína de unión a mRNA Nab2 (Carmody *et al.*, 2010), el regulador de la calcineurina Rcn2, el represor traduccional Caf20 o la proteína Gga1 (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016). Todo ello sugiere la importancia y multifuncionalidad de esta quinasa en la regulación de la fisiología celular en respuesta a situaciones que conllevan su activación.

2.2.2.6. Activación de la ruta CWI

Aunque inicialmente se utilizaban los tradicionales ensayos quinasa con Slt2 para determinar la activación de la ruta (Kamada *et al.*, 1995), posteriormente se comprobó que la intensidad de la respuesta se podía monitorizar fácilmente tanto en ensayos de *Western blotting* mediante la utilización de anticuerpos anti-fosfo-p44/42, que detectan también las formas doblemente fosforiladas de Slt2 (Martín *et al.*, 2000), como en experimentos con genes

INTRODUCCIÓN

reporteros cuya expresión se induce en condiciones de activación de la ruta desde promotores regulados por Rlm1 y Swi4/6 (Jung *et al.*, 2002). Estos primeros ensayos dejaron claro que la ruta CWI se activa en condiciones de estrés que afectan a la integridad de la pared celular (Klis *et al.*, 2006), como el tratamiento de las células con agentes que interactúan directamente con los polímeros de la pared celular, o mediante la eliminación por mutagénesis de proteínas necesarias para su biogénesis. La activación de Slt2 y, por tanto, la puesta en marcha del “mecanismo compensatorio” de rescate es capaz de prevenir la lisis celular en estas condiciones.

Entre estos agentes químicos que interfieren de forma directa en la biogénesis de la pared, están los ya mencionados RC y CFW, que se unen a la quitina (García *et al.*, 2004; Ketela *et al.*, 1999), la mezcla enzimática zimoliasa, que altera la pared por sus actividades β -1,3-glucanasa, proteasa y quitinasa (Rodríguez-Peña *et al.*, 2013), o, las equinocandinas como la caspofungina, que inhiben a la β -1,3-glucán sintasa (García *et al.*, 2017). No obstante, existen múltiples estreses que no parecen perturbar específicamente la pared celular, pero son capaces de estimular igualmente a la ruta CWI (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020a). En la Tabla 1 se detallan los estímulos que se han descrito como activadores, así como algunas características significativas de su acción sobre la ruta CWI, cómo es el tipo de estrés que generan, los sensores implicados en su detección, la metodología utilizada en la monitorización de la activación y el efecto de la estabilización osmótica sobre la activación. También se incluye si promueven o no la despolarización de la actina, ya que se ha descrito que, tras una situación de estrés térmico, hay un proceso de despolarización de la actina, seguido por una repolarización que depende de la ruta CWI, si bien aún no se conocen los detalles del mecanismo molecular implicado (Delley and Hall, 1999).

Tabla 1. Estímulos no específicos de pared celular que activan a la ruta CWI (adaptada de Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020a).

Estrés	Agente/ Estímulo	Sensor	Monitorización	Estabilización osmótica	Actina *	Referencias
Mal plegamiento de proteínas	Tunicamicina	Wsc1	Expresión de <i>SLT2-lacZ</i> P-Slt2	Sensibilidad: No		(Babour <i>et al.</i> , 2010; Bonilla and Cunningham, 2003; Chen <i>et al.</i> , 2005; Rousseau and Bertolotti, 2016)
	DTT		Expresión de <i>pPTP2-GFP</i> P-Slt2			(Chen <i>et al.</i> , 2005; Mizuno <i>et al.</i> , 2018)
	β -mercaptoetanol		P-Slt2			(Chen <i>et al.</i> , 2005)

	Fitoesfingosina (PHS)		P-Slt2 Deslocalización de septinas (Ruta ERSU)			(Piña <i>et al.</i> , 2018)
pH ácido	Ácido clorhídrico a pH 2.8	Mid2	Expresión de <i>PST1-lacZ</i> P-Slt2	Sensibilidad: Sí Activación: No		(Claret <i>et al.</i> , 2005)
pH básico	KOH pH 8.2 35 mM/ Tris pH 8.3 50 mM (medio tamponado)	Wsc1	P-Slt2	Sensibilidad: Sí Activación: Sí (atenuación)	No	(Kwon <i>et al.</i> , 2016; Serrano <i>et al.</i> , 2006)
	Pn-AMP1 (péptido antimicrobiano catiónico rico en Cys/Arg)	Wsc1	Sensibilidad			(Kwon <i>et al.</i> , 2016)
Estrés de membrana plasmática	Mecanoestrés compresivo (presión de 7 psi)	Mid2	Translocación de Pkc1-GFP a la membrana plasmática			(Mishra <i>et al.</i> , 2017)
	Mecanoestrés compresivo (presión de 0.4 MPa)	Mid2	Translocación de Pkc1-GFP a la membrana plasmática y deslocalización nuclear de Slt2			(Delarue <i>et al.</i> , 2017)
	Choque hipoosmótico		Ensayos quinasa <i>in vitro</i> P-Tyr Slt2 P-Slt2		Sí	(Davenport <i>et al.</i> , 1995; Hatakeyama <i>et al.</i> , 2017; Kamada <i>et al.</i> , 1995)
	SDS		P-Slt2 Expresión de <i>pMLP1-lacZ</i>		Sí	(Delley and Hall, 1999; Jiménez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2020b; Queralt and Igual, 2005)
	Clorpromazina		Ensayos quinasa <i>in vitro</i>			(Kamada <i>et al.</i> , 1995)
	Aceite de árbol del té/ Anfotericina B/ Nistatina		Reportero <i>lexA-RLM1-lacZ</i>			(Straede <i>et al.</i> , 2007)
	Ácido acético	Wsc1	P-Slt2			(Mollapour and Piper, 2006; Mollapour <i>et al.</i> , 2009)
	Alta temperatura	Mid2 Wsc1	Ensayos quinasa <i>in vitro</i> P-Slt2	Sensibilidad: Sí Activación: Sí	Sí	(Gray <i>et al.</i> , 1997; Kamada <i>et al.</i> , 1995; Ketela <i>et al.</i> , 1999; Martín <i>et al.</i> , 2000; Mensonides <i>et al.</i> , 2005; Rajavel <i>et al.</i> , 1999; Verna <i>et al.</i> , 1997)
	Baja temperatura	Wsc1	P-Slt2	Sensibilidad: Sí	No	(Córcoles-Sáez <i>et al.</i> , 2012)
Estrés oxidativo	Ácido 13-hidroperoxi-linoleico (LoaOOH)		P-Slt2		Sí	(Alic <i>et al.</i> , 2003)

INTRODUCCIÓN

	L-Dopa y otras catecolaminas (adrenalina, noradrenalina y dopamina)	Wsc1	Expresión de <i>p2xRLM1-lacZ</i> P-Slt2			(Staleva <i>et al.</i> , 2004)
	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Mtl1 Mid2 Wsc1	Expresión de <i>p2xRLM1-lacZ</i> P-Slt2	Fosforilación: No	Sí	(Jin <i>et al.</i> , 2013; Staleva <i>et al.</i> , 2004; Vilella <i>et al.</i> , 2005)
	Diamida	Mtl1	P-Slt2 Localización de Pkc1-GFP	Fosforilación: Sí	Sí	(Vilella <i>et al.</i> , 2005)
	Cloroquina	Wsc1	P-Slt2	Sensibilidad: Sí (a bajas dosis de cloroquina)		(Baranwal <i>et al.</i> , 2014)
	Cadmio	Mid2	P-Slt2			(Xiong <i>et al.</i> , 2015)
	Nanopartículas de óxido de Zinc	Wsc1	P-Slt2			(Babele <i>et al.</i> , 2018)
	Ácido valproico		P-Slt2	Sensibilidad: No		(Golla <i>et al.</i> , 2016)
Estrés genotóxico	Hidroxiurea		P-Slt2	Sensibilidad: No Fosforilación: No		(Liu and Levin, 2018; Queralt and Igual, 2005; Soriano-Carot <i>et al.</i> , 2012)
	Metil metano-sulfonato (MMS)		Cantidad y localización de Slt2-GFP P-Slt2	Sensibilidad: No Fosforilación: No		(Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 2010; Liu and Levin, 2018; Soriano-Carot <i>et al.</i> , 2012)
	Pleomicina		P-Slt2	Sensibilidad: No Fosforilación: No		(Soriano-Carot <i>et al.</i> , 2012)
	Radiación UV		P-Slt2	Sensibilidad: No/ Sí (Bryan) Fosforilación: No		(Bryan <i>et al.</i> , 2004; Soriano-Carot <i>et al.</i> , 2012)
	8-metoxipsoraleno (8-MOP)/ UVA		P-Slt2 Cantidad de Slt2	Sensibilidad: Sí		(Dardalhon <i>et al.</i> , 2009)
Metaloides	Arsenito [As(III)]		P-Slt2			(Ahmadpour <i>et al.</i> , 2016)
	Arsenato [As(V)]		P-Slt2	Sensibilidad: Sí		(Matia-González and Rodríguez-Gabriel, 2011)
Inhibición de TORC1	Rapamicina	Mid2 Wsc1	P-Slt2 Expresión génica regulada por Slt2 Ensayos quinasa <i>in vitro</i> (Fosforilación de Sic1-Thr173)	Activación: Sí Sensibilidad: Sí Despolarización de actina: Sí	Sí	(Krause and Gray, 2002; Moreno-Torres <i>et al.</i> , 2015; Soulard <i>et al.</i> , 2010; Torres <i>et al.</i> , 2002)
	Cafeína		P-Slt2	Fosforilación: Sí		(Kuranda <i>et al.</i> , 2006; Martín <i>et al.</i> , 2000)
Despolimerización de actina	Latrunculina B	No	P-Slt2 Ensayo de punto de control de la morfogénesis	Activación: Parcial	Sí	(Harrison <i>et al.</i> , 2001)
Estrés de carbonilo	Metilglioxal	No Wsc1/ Mid2	P-Slt2		Sí	(Nomura and Inoue, 2015)
Otros	Quercetina		P-Slt2			(Vilaça <i>et al.</i> , 2012)

	Cloruro de cesio		P-Slt2	Sensibilidad: Sí		(Casagrande <i>et al.</i> , 2009)
	Vanadato de sodio		P-Slt2	Fosforilación: Sí		(Martín <i>et al.</i> , 2000)
	Etanol		Expresión génica regulada por Slt2			(Udom <i>et al.</i> , 2019)

*Despolarización de actina.

Por otra parte, no todos los estímulos de la ruta conducen a la activación de Slt2 siguiendo el circuito canónico, sino que existen diferencias significativas en función del tipo de estrés. Por ejemplo, la zimoliasa induce una respuesta adaptativa transcripcional que depende de la MAPK Slt2 y del factor de transcripción Rlm1 a través de los componentes esenciales de la ruta CWI, como Pkc1, Bck1 y Mkk1/2 (Sanz *et al.*, 2017). Sin embargo, a diferencia de otros estreses, la fosforilación de Slt2 inducida por zimoliasa no depende de los mecanosensores ni de las GEFs de Rho1, sino que el daño en la pared celular generado por esta mezcla enzimática es detectado por los osmosensores Sho1 y Hkr1 junto con Opy2 de la rama SHO1 de la ruta HOG (Bermejo *et al.*, 2008; Rodríguez-Peña *et al.*, 2013), estableciéndose así un modelo de activación secuencial de las rutas HOG y CWI por zimoliasa (Bermejo *et al.*, 2008, 2010; García *et al.*, 2009).

Además, estímulos considerados canónicos, como el estrés térmico o el RC para la ruta CWI o el estrés hiperosmótico para la ruta HOG, inducen también la activación de la ruta de alta osmolaridad (Dunayevich *et al.*, 2018) y de integridad celular (García-Rodríguez *et al.*, 2005), respectivamente. De hecho, el estrés hiperosmótico induce la transcripción de Slt2 de forma dependiente de Hog1 y Rlm1 (Hahn and Thiele, 2002), e, incluso en ausencia de estrés, la ruta HOG modula la expresión de algunos genes relacionados con la biogénesis de la pared (Rodríguez-Peña *et al.*, 2010).

Varios trabajos consideran que es el glicerol el elemento mediador de la activación de ambas rutas (Dunayevich *et al.*, 2018; García-Rodríguez *et al.*, 2005; Laz *et al.*, 2020). El estrés hiperosmótico hace que los cambios en la presión de turgencia debidos a la producción de glicerol mediada por la ruta HOG sean detectados por el mecanosensor de la ruta CWI Mid2, dando lugar a la activación de esta ruta y a la fosforilación de Slt2 en respuesta a alta osmolaridad de manera dependiente de la funcionalidad de la ruta HOG (García-Rodríguez *et al.*, 2005). Igualmente, durante el estrés térmico, se produce una salida de glicerol desde el interior de la célula que provoca la activación de la ruta HOG a través de la rama SLN1, y esto está mediado por la activación de la ruta CWI, ya que en este contexto Slt2 regula la fosforilación del canal de glicerol Fps1, induciendo su apertura y la consecuente pérdida de

glicerol intracelular (Dunayevich *et al.*, 2018). Recientemente, el entrecruzamiento entre las rutas HOG y CWI descrito, por ejemplo, tras el tratamiento con zimoliasa, se ha achacado también a la acumulación de glicerol intracelular ocasionada por la activación de Hog1. Así, el incremento en la concentración de este osmolito es lo que, en parte, conduciría a la posterior activación de Slt2 (Laz *et al.*, 2020).

En consecuencia, aunque existen mecanismos que aseguran la fidelidad de cada ruta, también puede ser beneficioso para las células que tenga lugar un cierto grado de entrecruzamiento entre ellas, permitiendo una respuesta más eficaz o robusta ante un determinado tipo de estímulos.

Por otro lado, hay situaciones de estrés en las que la entrada de la señal en la ruta mediada por MAPKs se produce de forma intracelular, en vez de extracelularmente. Esto ocurre cuando, por ejemplo, la actividad de las MAPKs está modulada por la tasa de su desfosforilación por fosfatasas en lugar de por la tasa de su fosforilación por MAPKKs, como en el caso del estrés genotóxico, que induce la fosforilación de Slt2 a través de la degradación proteosomal de Msg5 (Liu and Levin, 2018). En la ruta HOG, ocurre algo similar con el arsenito [As(III)], que, tras entrar en la célula por el canal Fps1 y metabolizarse, inhibe a las fosfatasas Ptp2/3, traduciendo en un aumento de los niveles basales de fosforilación de Hog1 (Lee and Levin, 2018).

2.2.2.7. Regulación de la ruta CWI

La puesta en marcha de respuestas celulares sostenidas o transitorias a través de las vías de señalización de MAPKs requiere mecanismos reguladores precisos que definan las diferentes dinámicas que determinan los distintos resultados (Santos *et al.*, 2007). Una forma importante de regulación de estas rutas es a nivel de la fosforilación de la MAPK por proteínas fosfatasas, que cumplen varias funciones: reducir la actividad basal con el objetivo de prevenir el desencadenamiento de una respuesta no deseada en ausencia de estímulos relevantes, prevenir la activación excesiva de las MAPKs tras su estimulación, y restaurar el crecimiento celular normal tras las respuestas adaptativas (Saito and Tatebayashi, 2004).

A diferencia de la rápida y transitoria activación de Hog1 por osmoestrés, la señalización de la ruta CWI es más persistente, generando una respuesta lenta y sostenida en el tiempo. En condiciones de estrés de pared, generalmente, la MAPK Slt2 es fosforilada en los 10-15 minutos después del inicio del estrés, y esta activación alcanza su máximo valor tras 1 o 2

horas de tratamiento (de Nobel *et al.*, 2000). Tras el cese del estrés, la fosforilación de la MAPK decrece, pero puede aún detectarse incluso después de 6 horas (Bermejo *et al.*, 2008).

En este contexto, la actividad de Slt2 puede estar regulada negativamente mediante su desfosforilación por la actividad de diferentes proteínas fosfatasa (Martín *et al.*, 2005), como las tirosín fosfatasa Ptp2 y, en menor medida, Ptp3 (Mattison *et al.*, 1999), o las treonín/serín fosfatasa de especificidad dual (DSPs) Msg5 (Flández *et al.*, 2004) y Sdp1 (Collister *et al.*, 2002). Curiosamente, Ptp2 y Msg5 están transcripcionalmente inducidas en diversas condiciones de estrés de pared de manera dependiente de Slt2, indicando la existencia de una retroalimentación negativa transcripcional a este nivel (García *et al.*, 2004, 2009; Hahn and Thiele, 2002; Mattison *et al.*, 1999). Además, la regulación entre Slt2 y Msg5 es recíproca, porque se ha observado la fosforilación de Msg5 por Slt2 en respuesta a la activación de la ruta CWI, disminuyendo la afinidad entre estas dos proteínas (Flández *et al.*, 2004). Esto podría constituir un circuito de retroalimentación positiva para reducir la actividad de esta fosfatasa sobre Slt2, permitiendo la máxima activación de la ruta de manera prolongada en condiciones de estrés crónico (González-Rubio *et al.*, 2019).

Además de la regulación negativa ejercida sobre la MAPK, existen otras formas de disminuir la señalización de la ruta CWI, como la desfosforilación de la MAPKK Mkk1 por parte de la treonín/tirosín fosfatasa de tipo PP2C Ptc1 a través de la proteína adaptadora Nbp2, que interacciona con la MAPKKK Bck1 (Tatjer *et al.*, 2016), o la ubiquitinación de Pkc1 por Ubp3 (Wang *et al.*, 2008).

Adicionalmente, otros eventos de retroalimentación negativa contribuyen también a la atenuación de la respuesta de la ruta CWI. Por ejemplo, Slt2 ejerce una retroalimentación negativa mediante un mecanismo de retrofosforilación de Rom2 presente en la membrana plasmática, que una vez fosforilada se deslocaliza de la punta de la yema, disminuyendo así su actividad (Guo *et al.*, 2009). Asimismo, las MAPKKs Mkk1/2 también están sujetas a la retrofosforilación por parte de Slt2 (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007).

Por el contrario, una situación de autorregulación positiva ocurre cuando un factor de transcripción potencia su propia tasa de producción, amplificando así la expresión génica. Este es el caso de Rlm1, que, como se ha comentado anteriormente, modula la expresión de *RLM1*, *SLT2* y *MLP1* en respuesta a estrés de pared (García *et al.*, 2004). Por ello, para una correcta respuesta transcripcional de la ruta CWI se requiere la activación de Rlm1 mediante

su fosforilación por Slt2, pero para que esta respuesta sea máxima es necesaria además la concurrencia de este mecanismo de retroalimentación positiva (García *et al.*, 2016).

3. La biología sintética aplicada al estudio de las vías de señalización de MAPKs

La biología sintética se define como la aplicación de principios de ingeniería para el proceso de construcción e implementación de sistemas biológicos diseñados artificialmente. El objetivo esencial de la biología sintética es producir de forma predecible una amplia variedad de nuevas redes y rutas mediante la recombinación racional de partes biológicas modulares codificadas por DNA. Esto ofrece una amplia variedad de aplicaciones en ciencia, industria y sanidad (Blount *et al.*, 2012).

La ingeniería de las rutas de señalización tiene un gran potencial para el desarrollo de nuevas herramientas de investigación que permitan estudiar eventos celulares que son imposibles de detectar en los sistemas naturales, diseñar células de ensayo altamente flexibles en las que los sistemas artificiales puedan examinarse independientemente de su entorno original, desarrollar aplicaciones industriales o terapéuticas dirigidas por un control predecible de los comportamientos biológicos, y examinar mecanismos potencialmente evolutivos mediante la creación de nuevas dinámicas y conexiones de señalización (Furukawa and Hohmann, 2013).

La levadura es un organismo modelo muy atractivo para los estudios de biología sintética (Blount *et al.*, 2012). Las cinco rutas de MAPKs de *S. cerevisiae* están constituidas por más de 80 componentes, incluyendo sensores, quinasas, proteínas adaptadoras y factores de transcripción, y cada componente tiene distintos dominios de detección, interacción, catalíticos y/o reguladores, todos ellos considerados como potenciales dianas de la ingeniería biológica (Furukawa and Hohmann, 2013).

4. El arsenal antifúngico actual y la búsqueda de nuevas moléculas mediante estrategias de reposicionamiento de fármacos

La esencialidad de la pared celular fúngica para la viabilidad celular y la virulencia junto con el hecho de que la mayoría de los componentes y actividades enzimáticas necesarias para su biogénesis y remodelación no están presentes en mamíferos hacen de esta estructura una diana ideal para las intervenciones terapéuticas contra las infecciones fúngicas (Gow *et al.*, 2017; Tada *et al.*, 2013). Asimismo, la membrana plasmática y sus constituyentes, como

el ergosterol, los sensores de las rutas de señalización, y las ATPasas de membrana, representan otra diana importante de los fármacos antifúngicos (Heinisch, 2008).

Las opciones terapéuticas para infecciones fúngicas invasivas incluyen fundamentalmente tres clases estructurales de moléculas, los polienos, los azoles y las equinocandinas. La familia más antigua de antifúngicos son los polienos, que afectan a la integridad de la membrana. Los polienos, como la anfotericina B y la nistatina, se unen al ergosterol de las membranas fúngicas con una afinidad mayor que al colesterol, su análogo en mamíferos. La anfotericina B es fungicida y es el antifúngico con mayor espectro de acción disponible. Sin embargo, se usa como última opción en el tratamiento de las micosis debido a su elevada toxicidad, tanto nefrótica como para el sistema nervioso central (Hong *et al.*, 1998). Por el mismo motivo, la nistatina se usa únicamente para tratamientos a nivel local.

Más adelante, por la toxicidad que presentaban los polienos, el interés de los investigadores cambió hacia la inhibición específica de las enzimas implicadas en la biosíntesis de los componentes de la membrana plasmática. Los compuestos inhibidores predominantes de este tipo son los azoles, que están dirigidos a la inhibición de la desmetilación mediada por el citocromo P450 en la ruta de biosíntesis del ergosterol (Vanden Bossche *et al.*, 2003). Los azoles son la clase de antifúngicos más ampliamente empleada (Lass-Flörl, 2011), debido a que son extremadamente bien tolerados, aunque interfieren con el metabolismo de numerosos fármacos debido a su habilidad para inhibir al citocromo P450.

Por último, las equinocandinas son la adición más reciente a la farmacopea antifúngica, aunque su aplicación en la práctica clínica se inició hace ya casi dos décadas. Las equinocandinas, como la caspofungina, son capaces interferir selectivamente con la producción de β -1,3-glucano de la pared celular mediante la inhibición no competitiva de la β -1,3-glucán sintasa (Patil and Majumdar, 2017). La ausencia de β -1,3-glucano en mamíferos y su amplia distribución y esencialidad en los hongos han hecho de la glucán sintasa una buena diana antifúngica. Sin embargo, la eficacia de estos fármacos puede verse reducida tanto por la aparición de mutaciones en esta enzima como por la inducción de mecanismos compensatorios de la pared celular fúngica (Walker *et al.*, 2010), como el desencadenado por la activación de la ruta CWI.

A diferencia de los antimicrobianos frente a bacterias, el desarrollo de fármacos antifúngicos tiene que enfrentarse al hecho de que los patógenos fúngicos están más cercanamente

relacionados con el hospedador. Por ejemplo, el éxito de *S. cerevisiae* como organismo eucariótico modelo se debe a que muchos procesos bioquímicos y biológicos fundamentales están conservados de hongos a humanos. Consecuentemente, muchas moléculas que son tóxicas para la levadura afectan también a los humanos. Por este motivo, no sorprende que las tres clases principales de antifúngicos estén dirigidas a dianas estructurales que son específicas de los hongos (Roemer and Krysan, 2014). Sin embargo, los agentes antifúngicos convencionales están viendo disminuida su eficacia en el tratamiento de infecciones fúngicas debido a la aparición cada vez más frecuente de cepas resistentes, y el ritmo actual de desarrollo de antifúngicos no parece alcanzar las necesidades clínicas. Esto representa un gran desafío para el tratamiento de las infecciones fúngicas invasivas debido al limitado arsenal de agentes antifúngicos disponibles (Wiederhold, 2018). Una de las aproximaciones que se está llevando a cabo para el descubrimiento de nuevas moléculas antifúngicas es el reposicionamiento de fármacos ya aprobados (Nosengo, 2016).

El reposicionamiento de fármacos es el proceso de identificación de potenciales usos terapéuticos de fármacos conocidos, permitiendo el descubrimiento de terapias para enfermedades sin tratamiento (Jarada *et al.*, 2020). Por tanto, esta estrategia juega un papel importante en la optimización del proceso preclínico del desarrollo de nuevos fármacos mediante el ahorro de tiempo y coste en comparación con el proceso de descubrimiento *de novo* (Ashburn and Thor, 2004; Pushpakom *et al.*, 2018). El reposicionamiento de fármacos da cuenta aproximadamente del 30% de las nuevas drogas y vacunas aprobadas por la FDA en los últimos años (Jin and Wong, 2014), lo que indica su tendencia creciente y sus buenos resultados.

ANTECEDENTES & OBJETIVOS

Mediante aproximaciones de biología sintética, nuestro grupo de investigación ha diseñado y patentado un circuito genético de amplificación de la señal de la ruta CWI (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020; Martín *et al.*, 2015). Esta herramienta, denominada IPAC (*Integrity Pathway Activation Circuit*) (Figura 8), consiste en un alelo hiperactivo de una de las MAPKKs de la ruta, *MKK1^{S386P}* (Watanabe *et al.*, 1995), bajo el control del promotor de *MLP1*, uno de los genes que más se inducen al activarse la ruta y que se encuentra regulado por el factor de transcripción Rlm1 (García *et al.*, 2004). La activación de este circuito sintético por un estímulo sobre la pared celular da lugar a una inhibición del crecimiento debida a la hiperactivación de la ruta CWI. Además, a pesar del aumento en la señalización, la regulación de la ruta por los moduladores canónicos se mantiene (Alonso-Rodríguez, 2016). Por todo ello, ha demostrado ser una herramienta genética de gran potencial para el descubrimiento de nuevos estímulos y de reguladores tanto positivos como negativos de la señalización de esta ruta.

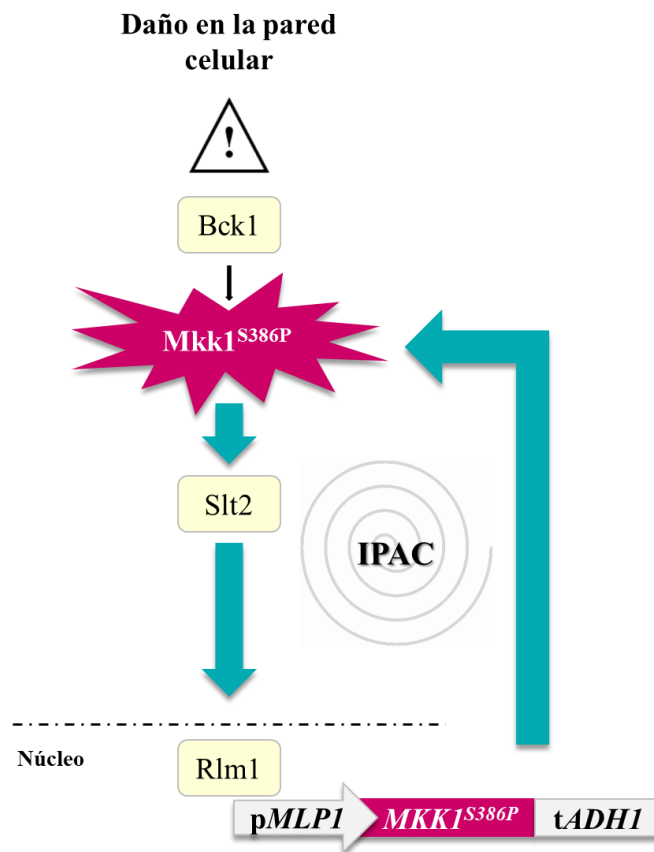


Figura 8. Esquema del circuito genético sintético de amplificación de la señal de la ruta de integridad celular o IPAC (*Integrity Pathway Activation Circuit*).

Con esta premisa, nuestro grupo de investigación realizó un rastreo de mutantes delecionados en 256 genes relacionados con señalización y apoptosis con el fin de hallar

reguladores de la señalización desconocidos hasta el momento, estimulando la ruta CWI con rojo Congo (RC), zimoliasa o el detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS) (Alonso-Rodríguez, 2016; Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020). Entre los mutantes capaces de recuperar el crecimiento de las células portadoras del circuito IPAC (Figura 9) y, por tanto, de cortar la hiperactivación de la ruta CWI, además de algunos defectivos en genes nuevos, se encontraron los mutados en componentes canónicos de la vía de señalización de integridad celular en el caso del RC, y de la rama SHO1 de la ruta HOG y de los módulos de MAPKs de ambas rutas en presencia de zimoliasa, como era de esperar. Sin embargo, en la señalización del SDS se identificaron mutantes en los componentes del módulo de MAPKs de la rama SLN1 de la ruta HOG Ssk2, Pbs2 y Hog1, además de los afectados en el módulo de MAPKs de la ruta CWI, lo que sugería un mecanismo de activación diferente al desencadenado por los otros dos estímulos. Por otro lado, la señal de este tensioactivo parecía ser detectada de manera intracelular, ya que la falta de ninguno de los sensores de la rama SHO1 de la ruta HOG ni de la ruta CWI ensayados permitieron el crecimiento de las células con el IPAC en presencia de SDS de manera significativa (Figura 9).

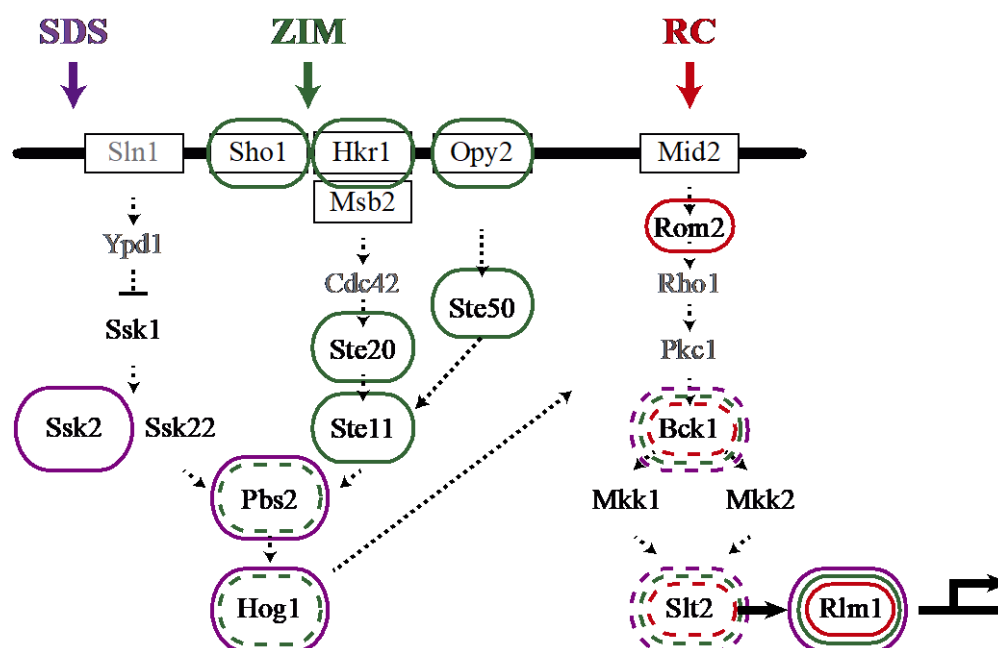


Figura 9. Resultado del rastreo de la subcolección de mutantes en genes no esenciales de *S. cerevisiae* relacionados con la ruta CWI y HOG capaces de suprimir la inhibición del crecimiento de las células portadoras del IPAC en presencia de RC, zimoliasa y SDS. En rojo se marcan aquellas proteínas cuya delección permitió el crecimiento en presencia de RC; en verde, las que lo hicieron con zimoliasa; y en morado los mutantes que crecieron en SDS. Los círculos discontinuos hacen referencia a los mutantes que muestran sensibilidad a estos estreses independientemente del circuito, y las proteínas en gris no fueron analizadas en el rastreo (adaptada de Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020).

Asimismo, se llevó a cabo otro rastreo empleando el IPAC, pero, en este caso, se ensayaron una serie de compuestos para identificar nuevos estímulos de la ruta CWI. Una de estas moléculas capaces de poner en marcha el circuito de forma específica fue el aminoglucósido neomicina, a diferencia de otros inhibidores de síntesis proteica como la higromicina B, la geneticina (G418) o la gentamicina (Alonso-Rodríguez, 2016).

Considerando todos estos antecedentes, los objetivos de esta tesis doctoral fueron los siguientes:

1. Caracterizar la dinámica de activación del circuito genético sintético de amplificación de la señal de la ruta de integridad celular o IPAC.
2. Analizar el entrecruzamiento desde el eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG hasta el módulo de MAPKs de la ruta CWI en la señalización estimulada por SDS.
3. Estudiar la respuesta celular frente a la neomicina y la función de la ruta CWI, así como de otras vías de señalización, en dicha respuesta.
4. Rastrear una colección comercial de compuestos aprobados por la FDA para su uso en humanos empleando el circuito IPAC en busca de nuevos activadores y reguladores negativos de la ruta CWI, siguiendo una estrategia de reposicionamiento de fármacos.

MATERIALES & MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos empleados

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas en este trabajo, su genotipo y su procedencia.

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i>	<i>Euroscarf</i> , Alemania (Y00000)
Y00993	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y05280	Isogénica BY4741; <i>rom2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01328	Isogénica BY4741; <i>bck1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02739	Isogénica BY4741; <i>rlm1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06116	Isogénica BY4741; <i>sho1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y05406	Isogénica BY4741; <i>ssk2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y07101	Isogénica BY4741; <i>pbs2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02724	Isogénica BY4741; <i>hog1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04911	Isogénica BY4741; <i>msn4Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06957	Isogénica BY4741; <i>hot1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06266	Isogénica BY4741; <i>msn1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y07117	Isogénica BY4741; <i>msn2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02045	Isogénica BY4741; <i>sko1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y03322	Isogénica BY4741; <i>smp1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04700	Isogénica BY4741; <i>rom1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06028	Isogénica BY4741; <i>tus1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
YMM6	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ::kanMX4</i> ; <i>RLM1-6MYC::LEU2</i>	Dra. María José Marín
YMM7	Isogénica BY4741; <i>MSG5-6MYC::LEU2</i>	Dra. María José Marín
YMM3	Isogénica BY4741; <i>SLT2-6MYC::LEU2</i>	(Marín <i>et al.</i> , 2009)
YMJ21	Isogénica BY4741; <i>MKK1-6MYC::LEU2</i>	(Jiménez-Sánchez <i>et al.</i> , 2007)
YMJ22	Isogénica BY4741; <i>MKK2-6MYC::LEU2</i>	(Jiménez-Sánchez <i>et al.</i> , 2007)
YLP3	Isogénica BY4741; <i>BCK1-6MYC::LEU2</i>	Dra. Lorena Palacios
BY4742	<i>MATa his3 leu2 met15 ura3</i>	<i>Euroscarf</i> (Y10000)
YMJ29	Isogénica BY4742; <i>mkk2Δ::kanMX4</i> ; <i>mkk1Δ::SpHIS5</i>	(Jiménez-Sánchez <i>et al.</i> , 2007)
YEE2019	Isogénica BY4741; <i>RLM1-6MYC::URA3</i>	Este trabajo. <i>RLM1-6MYC</i> integrado a partir del plásmido pRS306-RLM1-6MYC digerido con la endonucleasa de restricción <i>BclI</i>

YEE2020	Isogénica BY4741; <i>ssk2Δ::kanMX4</i> ; <i>RLM1-6MYC::URA3</i>	Este trabajo. <i>RLM1-6MYC</i> integrado a partir del plásmido pRS306-RLM1-6MYC digerido con la endonucleasa de restricción <i>BclI</i>
Y3656	<i>MATα can1Δ::MFA1pr-HIS3- MFA1pr-LEU2 his3 leu2 ura3 met15 lys2</i>	(Schuldiner <i>et al.</i> , 2005)
YSTH1	Isogénica Y3656; <i>HO::natMX6::SSB1</i>	Dr. Humberto Martín
YSTH2	Isogénica Y3656; <i>HO::pMLP1-MKK1^{S386P}-tADH-natMX6::SSB1</i>	Dr. Humberto Martín
YSTH3	Isogénica Y3656; <i>slt2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH4	Isogénica Y3656; <i>wsc1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH5	Isogénica Y3656; <i>mid2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH6	Isogénica Y3656; <i>rom2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH7	Isogénica Y3656; <i>bck1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH8	Isogénica Y3656; <i>mkk1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH9	Isogénica Y3656; <i>mkk2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH10	Isogénica Y3656; <i>rlm1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH11	Isogénica Y3656; <i>swi4Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH12	Isogénica Y3656; <i>swi6Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH13	Isogénica Y3656; <i>msg5Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH14	Isogénica Y3656; <i>ptc1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH15	Isogénica Y3656; <i>msb2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH16	Isogénica Y3656; <i>sho1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH17	Isogénica Y3656; <i>sln1 damp::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH18	Isogénica Y3656; <i>ssk2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH19	Isogénica Y3656; <i>pbs2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH20	Isogénica Y3656; <i>hog1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH21	Isogénica Y3656; <i>slm1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH22	Isogénica Y3656; <i>slm2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH23	Isogénica Y3656; <i>pkh1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH24	Isogénica Y3656; <i>pkh2Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH25	Isogénica Y3656; <i>gas1Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH26	Isogénica Y3656; <i>kre6Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)
YSTH27	Isogénica Y3656; <i>chs3Δ::natMX6</i>	(Martin <i>et al.</i> , 2015)

MATERIALES Y MÉTODOS

PW245	Isogénica EG123 (<i>MATa trp1 leu2 ura3 his4 can1</i>); <i>FUS1::lacZ::LEU2</i> ; <i>HOG1-GFP::TRP1</i>	(Westfall and Thorner, 2006)
PW349	Isogénica EG123 (<i>MATa trp1 leu2 ura3 his4 can1</i>); <i>FUS1::lacZ::LEU2</i> ; <i>HOG1-GFP::TRP1</i> ; <i>nmd5Δ::URA3</i>	(Westfall and Thorner, 2006)
APY276	Isogénica BY4742; <i>nmd5Δ::HIS3</i>	(Perez and Thorner, 2019)
LD3342	Isogénica W303 (<i>MATa leu2 trp1 can1 ura3 ade2 his3</i>); <i>bar1Δ::LEU2</i> ; <i>PRM1::pPRM1-mCherry::hygB</i> ; <i>STL1::pSTL1-YFP::URA3</i> ; <i>BMH2::pBMH2-CFP::TRP1</i>	(Baltanas <i>et al.</i> , 2013)
RB3376	Isogénica W303 (<i>MATa leu2 trp1 can1 ura3 ade2 his3</i>); <i>bar1Δ::LEU2</i> ; <i>slt2Δ::kanMX6</i> ; <i>PRM1::pPRM1-mCherry::hygB</i> ; <i>STL1::pSTL1-YFP::URA3</i> ; <i>BMH2::pBMH2-CFP::TRP1</i>	(Baltanas <i>et al.</i> , 2013)
YSP69	Isogénica W303 (<i>MATa leu2 trp1 can1 ura3 ade2 his3</i>); <i>HTA2::HTA2-CFP::Sin marcador</i> ; <i>HOG1::HOG1-Venus::TRP1</i>	(Streuli and Akhtar, 2009)

Para las técnicas de biología molecular, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5α (F^- ϕ 80*lacZ*Δ*M15* Δ(*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_k^- , m_k^+) *phoA supE44 λ^- thi-1 gyrA96 relA1*).

2. Medios y condiciones generales de incubación de los microorganismos

Las cepas de levadura se incubaron en medios completos (YPD, generalmente, o SD completo) (Tabla 3) a 30 °C en agitación (180 r.p.m.), en caso de tratarse de medio líquido. Los medios carentes de alguna base nitrogenada o de algún aminoácido fueron empleados cuando las cepas portaban plásmidos para evitar su pérdida, o para la selección de transformantes, y los medios con galactosa (YPG y SG) (Tabla 3) se usaron para inducir la expresión de genes bajo el control del promotor *GAL1* en las células de levadura, previamente incubadas en un medio con rafinosa (SR) como única fuente de carbono (Tabla 3).

Cuando fue necesario, se añadieron al medio de cultivo diferentes compuestos, como rojo Congo (*Merck*), zimoliasa 100T (*MP Biomedicals*), dodecil sulfato sódico (SDS) (*Duchefa Biochemie*) o sulfato de neomicina (*Gibco®*, *Thermo Fisher Scientific*), entre otros, previamente disueltos en agua estéril.

E. coli se cultivó a 37 °C en medio LB (Tabla 3) suplementado con el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 μg/mL como presión selectiva para la selección de transformantes.

Tabla 3. Medios de cultivo utilizados en este trabajo, su composición, su utilidad y la referencia.

Nombre	Composición	Utilidad	Referencia
LB (Luria-Bertani)	1% bactotripton, 0.5% extracto de levadura y 0.5% NaCl	Medio rico utilizado para el crecimiento de bacterias	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
YPD (<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>)	1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa	Medio completo para el cultivo de levaduras	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
YPG (<i>Yeast extract Peptone Galactose</i>)	1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% galactosa	Medio rico que permite la inducción de la expresión de genes controlados bajo el promotor <i>GALI</i>	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
Medio Sintético SD (<i>Synthetic Dextrose</i>)	2% glucosa, 0.17% base nitrogenada para levaduras, 0.5% sulfato amónico y 0.19% de mezcla de aminoácidos comercial (<i>Formedium</i>)	Medio sintético para el crecimiento de levaduras. Se suplementa con los aminoácidos y bases nitrogenadas correspondientes para la selección y el mantenimiento de transformantes portadores de diferentes marcadores de auxotrofías	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
Medio Sintético SR (<i>Synthetic Raffinose</i>)	1.5% rafinosa, 0.17% base nitrogenada para levaduras, 0.5% sulfato amónico y 0.19% de mezcla de aminoácidos comercial (<i>Formedium</i>)	A diferencia del medio SD, la glucosa es sustituida por rafinosa para impedir que el promotor <i>GALI</i> se encuentre reprimido	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)
Medio Sintético SG (<i>Synthetic Galactose</i>)	2% galactosa, 0.17% base nitrogenada para levaduras, 0.5% sulfato amónico y 0.19% de mezcla de aminoácidos comercial (<i>Formedium</i>)	Medio sintético que permite la inducción de la expresión de genes controlados bajo el promotor <i>GALI</i>	(Sherman <i>et al.</i> , 1986)

Para la preparación de medios sólidos, se añadieron 24 g/L (2.4%) de agar, y todos los medios se esterilizaron en el autoclave a 121 °C y a 1 atm de presión durante 20 minutos.

3. Determinación del crecimiento celular

El seguimiento del crecimiento de los cultivos en medio líquido se hizo a través de la medida de su densidad óptica (D.O._{600 nm}) en un espectrofotómetro *Beckman DU® 640* (*Beckman*).

Para ello, se realizaron las diluciones adecuadas de forma que la medida de densidad óptica se encontrara en el intervalo de linealidad del espectro de absorción (0.05-0.5).

4. Conservación de los microorganismos

Las cepas de levadura se conservaron a una temperatura de -80 °C en una solución de glicerol al 50% (v/v), mientras que la conservación de las cepas de *E. coli* portadoras de los diferentes plásmidos se llevó a cabo también a -80 °C en glicerol al 25% (v/v) tras su crecimiento en medio LB con ampicilina.

5. Técnicas básicas de biología molecular

En general, las técnicas de biología molecular se llevaron a cabo siguiendo protocolos convencionales (Sambrook and Russel, 2001; Ausubel *et al.*, 1993).

La extracción de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó mediante la técnica básica de lisis alcalina, pero cuando se requirió una mayor pureza del DNA extraído, se utilizó el sistema comercial *NZYMiniprep* (*Nzytech*). Para la extracción de RNA, se empleó el kit comercial *Macherey-Nagel Nucleospin Mini Kit* (*Macherey-Nagel*). La pureza de ambos tipos de ácidos nucleicos se determinó en el *NanoDrop™ 2000c* (*Thermo Fisher Scientific*).

Las amplificaciones de DNA para la construcción de plásmidos se hicieron mediante reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), bajo las condiciones adecuadas en cada caso, en el termociclador *MiniCycler™ PTC-150* (*MJ Research*) con la Taq DNA polimerasa de alta fidelidad *Expand™* (*Roche*). Las endonucleasas de restricción fueron suministradas por la casa comercial *NZYTech*, y la T4 DNA ligasa para ligar los insertos con los vectores plasmídicos por *Roche*.

La visualización del DNA se realizó tras su separación por tamaño durante la electroforesis en geles de agarosa al 1%, preparados en tampón TAE (Tris base 40 mM, ácido acético 20 mM, EDTA 1 mM) y teñidos después con una solución del agente intercalante *GelRed®* (*Sigma*) para poder observar el DNA en un transiluminador de luz UV *MiniLumi* (*DNR Bio-Imaging Systems*). La elución de fragmentos de DNA de los geles de agarosa, así como la purificación de los productos de PCR, se realizaron utilizando el sistema comercial *GeneClean™* (*MP Biomedicals*).

La transformación de *E. coli* se realizó según el método de Inoue (Inoue *et al.*, 1990; Sambrook and Russell, 2006), y la de *S. cerevisiae* con acetato de litio y polietilenglicol (PEG) (Ito *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1992).

Los plásmidos empleados en la realización de este trabajo se detallan a continuación en la Tabla 4, al igual que los oligonucleótidos en la Tabla 5.

Tabla 4. Plásmidos manejados durante la realización de este trabajo, sus características y su procedencia.

Nombre	Características	Procedencia
YCplac111	<i>ori CEN4 bla LEU2 lacZ</i>	(Gietz and Akio, 1988)
YCplac111-IPAC	<i>ori CEN4 bla LEU2 lacZ pMLP1-MKK1^{S386P}-tADH</i>	(Alonso-Rodríguez, 2016; Jiménez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2020)
YEp352-pMLP1-lacZ	<i>ori 2μ bla URA3 pMLP1-lacZ</i>	(García <i>et al.</i> , 2009)
pHR70	<i>ori CEN4 bla URA3</i>	(Martin <i>et al.</i> , 1993)
pHR70-IPAC	<i>ori CEN4 bla URA3 pMLP1-MKK1^{S386P}-tADH</i>	(Alonso-Rodríguez, 2016; Jiménez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2020)
pCW194	Derivado del pRS313 sin las dianas de restricción del sitio de clonación múltiple desde <i>XhoI</i> hasta <i>EcoRI</i> inclusive (<i>ori CEN6 bla HIS3 lacZ</i>)	(Wu <i>et al.</i> , 1999)
pRS413-pGAL1-SSK2^{AN}	<i>ori CEN6 bla HIS3 lacZ pGAL1-SSK2^{A(M1-C1172)}</i>	(Nagiec and Dohman, 2012)
pRS416-HOG1-GFP	<i>ori CEN6 bla URA3 lacZ HOG1-GFP</i>	(Ferrigno <i>et al.</i> , 1998)
pRS416-HOG1^{TA/YA}-GFP	<i>ori CEN6 bla URA3 lacZ HOG1^{T174A/Y176A}-GFP</i>	(Ferrigno <i>et al.</i> , 1998)
pRS416-HOG1^{KM}-GFP	<i>ori CEN6 bla URA3 lacZ HOG1^{L52M}-GFP</i>	(Ferrigno <i>et al.</i> , 1998)
pEG(KG)	<i>ori 2μ bla URA3 pGAL1-GST</i>	(Mitchell <i>et al.</i> , 1993)
pEG(KG)-PBS2^{EE}	<i>ori 2μ bla URA3 pGAL1-GST-PBS2^{S514E,T518E}</i>	(Jiménez-Gutiérrez <i>et al.</i> , 2020b)
pEG(KG)-HOG1	<i>ori 2μ bla URA3 pGAL1-GST-HOG1</i>	Este trabajo. Subclonación en <i>BamHI/HindIII</i> de la amplificación por PCR con los oligonucleótidos HOG1 fw y HOG1 rv
pEG(KG)-SLT2	<i>ori 2μ bla URA3 pGAL1-GST-SLT2</i>	Ibarra, 2013

MATERIALES Y MÉTODOS

pEG(KG)-MKK1	<i>ori 2μ bla URA3 pGAL1-GST-MKK1</i>	(Soler <i>et al.</i> , 1995)
pRS306-RLM1-6MYC	Integrativo <i>bla URA3 lacZ RLM1-6MYC</i>	(Marín <i>et al.</i> , 2009)

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo, su secuencia y para qué se han empleado.

Nombre	Secuencia	Uso
GST up	5'-GGATGCGTTCCCAAAATTAG-3'	Secuenciar la construcción pEG(KG)-HOG1
HOG1 fw	5'-CGGGATCCATGACCACTAACGAGGAATTC-3'	Amplificar el gen <i>HOG1</i> para la construcción pEG(KG)-HOG1. Se añadió la diana de la enzima de restricción <i>Bam</i> HI al principio de la secuencia del gen amplificado
HOG1 rv	5'-CCCAAGCTTTTACTGTTGGAATCATTAGC-3'	Amplificar el gen <i>HOG1</i> para la construcción pEG(KG)-HOG1. Se añadió la diana de la enzima de restricción <i>Hind</i> III al final de la secuencia del gen amplificado
ACT1 fw	5'-ACGAAAGATTCAGAGCCCCA-3'	Amplificación del gen <i>ACT1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
ACT1 rv	5'-GCAGATTCCAAACCCAAAACA-3'	
MLP1 fw	5'-TGAATTATCAAGAATGCACAAAAGC-3'	Amplificación del gen <i>MLP1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real
MLP1 rv	5'-TCCTTCCCTTCAAACATTGGTT-3'	

6. Cultivo y recogida de las células de levadura

Las cepas de levadura a estudiar se inocularon en el medio de cultivo líquido apropiado, con o sin presión selectiva, y se incubaron en agitación durante toda la noche (16 horas, aproximadamente). Al día siguiente, los cultivos en fase estacionaria de crecimiento ($D.O_{600\text{ nm}} \approx 4.5$) se refrescaron a una $D.O_{600\text{ nm}}$ de 0.3 y se incubaron durante 2-3 horas más hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. En este momento, se procedió a la adición de los compuestos indicados en cada experimento, siempre reservando una parte del cultivo refrescado como control sin tratamiento.

Transcurrido el tiempo especificado en cada experimento, se recogieron las células mediante el centrifugado de 5-25 mL de cultivo a 4 °C y 2,500 r.p.m. durante 2 minutos. Tras eliminar el sobrenadante, las células se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

En el caso de necesitar la inducción de genes regulados por el promotor *GALI*, los cultivos saturados en medio SR se ajustaron por la mañana a una D.O._{600 nm} de 0.3 en 50 mL de medio SG o YPG y se incubaron durante 4-6 h, antes de su centrifugación a 4°C.

7. Detección de proteínas mediante *Western blotting*

7.1. Obtención de los extractos proteicos

Las células, recogidas como se describe previamente y descongeladas, se resuspendieron en 100-300 µL de tampón de lisis (Tris-HCl pH 7.5 50 mM, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, β-glicerol fosfato 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM y ortovanadato sódico 1 mM) suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas *Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets EDTA-Free (Thermo Fisher Scientific)*, el agente reductor ditioneitol (DTT) a 10 mM y el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 3 mM. La obtención del extracto celular se realizó por agitación con bolitas de vidrio de 0.75-1 mm de diámetro en dos ciclos de 30 segundos a 5.5 m/s en la *FastPrep®-24 (MP Biomedicals)*, esperando 5 minutos en hielo entre ciclos. Tras una centrifugación de 15 minutos a 13,000 r.p.m., se determinó la concentración proteica del sobrenadante correspondiente al extracto crudo midiendo su absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro *Beckman DU® 640 (Beckman)* o en el *NanoDrop™ 2000c (Thermo Fisher Scientific)*, y se ajustaron todas las muestras con tampón de lisis a la de menor concentración. Finalmente, se añadió el mismo volumen de tampón de carga para SDS-PAGE 2X (Tris-HCl pH 6.8 125 mM, 5% SDS, 25% glicerol, 0.6 g de azul de bromofenol y DTT 0.25 M) que de extracto ajustado, y se hirvieron las muestras durante 5 minutos a 99 °C para la desnaturalización proteica.

7.2. Electroforesis PAGE-SDS, transferencia a la membrana de nitrocelulosa e inmunodetección de las proteínas

Para la electroforesis en condiciones desnaturalizantes o SDS-PAGE (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) se prepararon previamente los geles separador (10% de la mezcla acrilamida-bisacrilamida al 30%, Tris-HCl pH 8.8 0.38 M, 0.1% SDS, 0.05% persulfato amónico (PSA) y 1.3 µL/mL tetrametiletilendiamina (TEMED)) y concentrador (5% de la mezcla acrilamida-bisacrilamida al 30%, Tris-HCl pH 6.8 0.25 M, 0.1% SDS, 0.1% PSA y 2 µL/mL TEMED). A continuación, se cargaron en cada pocillo 7.5-15 µL de muestra, así como 1.5 µL del patrón de pesos moleculares (*Abcam*) para determinar el tamaño de las

MATERIALES Y MÉTODOS

proteínas de las muestras, y la electroforesis se llevó a cabo en cubetas *Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad)* con tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192.6 mM y 0.1% SDS) y a un voltaje constante de 150-180 voltios.

Posteriormente, las proteínas separadas por peso molecular se transfirieron desde el gel a una membrana de nitrocelulosa (*Amersham, Protran Premium 0.45 µm Nitrocellulose, GE Healthcare Life Sciences*), y como material protector y absorbente se utilizó papel *Whatman 3MM Chr*, así como dos esponjas, todo inmerso en tampón de transferencia (Tris 48 mM, glicina 38.6 mM, 0.037% SDS y 20% etanol). La transferencia se realizó en cubetas *Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad)* y a un voltaje constante de 100-110 voltios durante 1 hora. Previamente a la incubación de la membrana de nitrocelulosa con el anticuerpo primario en cuestión, esta se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente (TA) en agitación con una solución de leche desnatada al 5% en PBS. Después, se incubó una hora a TA o durante toda la noche en frío y en agitación con el anticuerpo primario disuelto en una solución de PBS-Tween-20 al 0.1% (T-PBS) y 1% de leche. Transcurrido este tiempo, se realizaron 5 lavados con T-PBS de 5 minutos cada uno, para eliminar el anticuerpo no adherido. Seguidamente, la membrana se incubó de nuevo durante una hora a TA, en agitación y oscuridad, con un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo con dos posibles espectros de emisión, a 680 nm (canal de detección 700) o 780 nm (canal de detección 800), diluido en la misma solución que el anticuerpo primario. Por último, se hicieron 5 lavados con T-PBS y un último lavado con agua desionizada. Para la visualización de las proteínas marcadas, se escaneó la membrana en el escáner *Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences)*.

La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó mediante el procesamiento de las imágenes con el programa *Image Studio (LI-COR)*.

Todos los anticuerpos empleados en este trabajo se recogen en la Tabla 6.

Tabla 6. Anticuerpos utilizados para la detección de proteínas estudiadas en este trabajo, sus características, la dilución a la que fueron utilizados y la casa comercial suministradora.

Nombre	Características	Dilución	Casa comercial
Anti-G6PDH	Policlonal de conejo	1:50,000	<i>Sigma</i>
Anti-GFP (JL-8)	Monoclonal de ratón	1:1,000	<i>Clontech</i>
Anti-GST (Z-5)	Policlonal de conejo	1:2,000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>

Anti-Hog1 (y-215)	Policlonal de conejo	1:1,000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Anti-Myc (4A6)	Monoclonal de ratón	1:1,000	<i>Merck Millipore</i>
Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Monoclonal de conejo	1:500	<i>Cell Signalling</i>
Anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)	Monoclonal de conejo	1:1,000	<i>Cell Signalling</i>
Anti-Slt2 (E-9)	Monoclonal de ratón	1:1,000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
IRDye 680CW Goat anti-mouse	Ac. secundario de ratón (rojo)	1:5,000	<i>LI-COR Biosciences</i>
IRDye 680CW Goat anti-rabbit	Ac. secundario de conejo (rojo)	1:5,000	<i>LI-COR Biosciences</i>
IRDye 800CW Goat anti-mouse	Ac. secundario de ratón (verde)	1:5,000	<i>LI-COR Biosciences</i>
IRDye 800CW Goat anti-rabbit	Ac. secundario de conejo (verde)	1:5,000	<i>LI-COR Biosciences</i>

8. Ensayo de determinación de la actividad β -galactosidasa

Para cuantificar la actividad transcripcional de la ruta CWI mediada por Rlm1, las células transformadas con el plásmido YEp352-pMLP1-lacZ, estimuladas con el agente pertinente y recogidas como se expone previamente, se resuspendieron una vez descongeladas en 150 μ L de tampón de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8, DTT 1 mM y 20% glicerol) y 5 μ L de PMSF 0.1 M, para proceder a su rotura con bolitas de vidrio de 0.75-1 mm de diámetro sometiendo las muestras a dos ciclos de 35 segundos a una intensidad de 5.5 m/s en la *FastPrep®-24* (MP Biomedicals). Tras 15 min de centrifugación en frío, se determinó la concentración proteica de cada extracto celular por el método de Bradford.

La mezcla de reacción del ensayo de β -galactosidasa consistió en 70 μ L de tampón Z (Na_2HPO_4 60 mM, NaH_2PO_4 40 mM, 0.075% KCl y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 100 μ M) a los que se añadieron 10 μ L de extracto proteico. A continuación, se añadieron 20 μ L del sustrato colorimétrico *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) (*Sigma*) a 4 mg/mL. El ONPG es convertido por la enzima β -galactosidasa en galactosa y *o*-nitrofenol, que es un compuesto de color amarillo medible espectrofotométricamente a una longitud de onda de 415 nm. Esta reacción tiene lugar a 30 °C. Una vez que apareció la coloración amarilla, se paró la reacción mediante la adición de 50 μ L de Na_2CO_3 1 M. La medida de las absorbancias a 415 nm se realizó en el lector de placas multipocillo *Bio-Rad 680 Microplate Reader* (Bio-Rad).

El resultado se expresó calculando la actividad específica β -galactosidasa de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{Abs}_{415 \text{ nm}} \times 0.17}{0.0045 \times \text{proteína (mg/mL)} \times \text{volumen de extracto (mL)} \times \text{tiempo de incubación (min)}}$$

9. Co-purificación de proteínas

Los extractos proteicos de las células transformadas con un vector con promotor *GAL1* e incubadas en un medio con galactosa se obtuvieron de manera similar a la descrita en el apartado 7.1, pero en condiciones no desnaturalizantes para evitar la pérdida de la interacción entre las proteínas, por lo que el tampón de lisis carecía en este caso de Tritón X-100 y de SDS.

Después de igualar la cantidad de proteína de los extractos, se tomaron 10 μL como control de los extractos sin purificar (*input*), que se hirvieron en tampón de carga para SDS-PAGE 2X como se ha descrito anteriormente. Sobre el volumen de extracto restante, se añadieron 50-100 μL de la matriz *Glutathione SepharoseTM 4B* (GE Healthcare Life Sciences) al 50%, previamente equilibrada con el mismo tampón de lisis mediante la realización de 3 lavados con el doble de volumen. Esta mezcla se incubó durante toda la noche a 4°C en agitación rotatoria. A la mañana siguiente, se centrifugaron las muestras a 3,000 r.p.m. en frío, y se hicieron 5 lavados de la matriz con 300 μL de tampón de lisis. Finalmente, se hirvieron los pellets en 15 μL de tampón de carga para SDS-PAGE 2X durante 5 minutos con el fin de separar las proteínas de la matriz (*pull-down*). En los geles de poliacrilamida se cargaron 10 y 15 μL por pocillo de *input* y *pull-down*, respectivamente, para la inmunodetección de las proteínas por *Western blotting*.

10. Análisis de sensibilidad celular

La sensibilidad o resistencia de las cepas a diferentes compuestos presentes en el medio de cultivo se determinó mediante distintas aproximaciones.

10.1. Ensayo de crecimiento de diluciones decimales seriadas

La D.O._{600 nm} de los cultivos en fase estacionaria de la noche anterior se ajustó a 0.5 con el mismo medio fresco y, a partir de esta concentración inicial, se realizaron diluciones decimales seriadas en volúmenes de 200 μL , de los cuales se sembraron 5 μL con el

replicador *Multi-blot VP 407AH* (V&P Scientific, INC) sobre la superficie de las placas de medio con el estímulo indicado en cada experimento. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48-72 h.

10.2. Estudio de la sensibilidad celular en placa multipocillo

En primer lugar, se diluyeron los cultivos saturados hasta una D.O._{600 nm} de 0.01 con medio fresco YPD 2X. Paralelamente, en una placa multipocillo estéril, se hicieron diluciones seriadas 1:2 del compuesto a ensayar con agua estéril en un volumen de 75 µL, sobre los que se añadieron las suspensiones celulares ajustadas hasta alcanzar un volumen final de 150 µL. Para todas las cepas analizadas, se reservó un pocillo sin compuesto, solo con medio y células, para poder considerarlo posteriormente como control positivo de crecimiento. La placa se incubó en estático a 30 °C durante 12.5-24 h, y el crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica de cada pocillo a 595 nm en el lector de placas multipocillo *Bio-Rad 680 Microplate Reader* (Bio-Rad).

10.3. Ensayo de halo de inhibición

Se inocularon 50-100 µL de los cultivos en fase estacionaria de las células a evaluar en 4 mL de YPD-0.7% agar, y la mezcla se vertió cubriendo homogéneamente toda la superficie de una placa de medio sólido YPD. A continuación, se depositaron discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro estériles impregnados previamente con 20 µL del compuesto en cuestión a la concentración adecuada para cada experimento. Tras 24-48 h de incubación a 30 °C, se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento generado por la difusión del compuesto desde el disco por el agar.

11. Rastreo de la colección de compuestos *Prestwick Chemical Library*®

La colección comercial *Prestwick Chemical Library*® consta de 1,280 compuestos dispuestos en 16 placas multipocillo y disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración de 10 mM. Esta colección nos fue cedida por el Dr. Óscar Zaragoza, del Centro Nacional de Microbiología (CNM) en el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII).

Se hicieron dos diluciones sucesivas 1:10 de las soluciones de los compuestos con tampón MES pH 6.5 50 mM, dispensando un volumen de 50 µL por pocillo. A este volumen se añadieron otros 50 µL de células a una D.O._{600 nm} de 0.01 en YPD 2X-MES pH 6.5 50 mM ajustada a partir del cultivo saturado de la cepa Y3656 con y sin circuito integrado. Por tanto,

la concentración final de los compuestos fue de 50 μ M. Las placas multipocillo se incubaron a 30 °C durante 24 h, y se midió el crecimiento celular mediante el uso del lector de placas multipocillo *Bio-Rad 680 Microplate Reader (Bio-Rad)*.

11.1. Búsqueda de moléculas estimuladoras de la ruta CWI

Una vez medida la D.O. $_{595\text{ nm}}$ de cada pocillo y de restarle el valor obtenido en el pocillo del blanco correspondiente al medio sin células, se normalizaron los datos dividiendo cada valor por la D.O. $_{595\text{ nm}}$ del control de crecimiento sin compuesto, y se calculó el porcentaje de inhibición en cada caso.

Se consideró a los fármacos que inhibieron el crecimiento de la levadura, tanto en presencia como en ausencia del IPAC, como mínimo un 50% respecto al control como compuestos con actividad antifúngica, y a los que inhibieron como mínimo un 50% a la cepa con el circuito y menos de un 50% a las células carentes de IPAC como moléculas activadoras de la ruta CWI.

El rastreo se hizo por triplicado, y se consideraron como compuestos positivos aquellos que cumplieron los criterios anteriormente descritos en al menos dos de las tres réplicas. Los valores de estos compuestos positivos en cada rastreo se recogen en las Tablas I y II del Anexo I.

11.2. Búsqueda de moduladores negativos de la ruta CWI

En este caso, se llevó a cabo el rastreo únicamente con la cepa portadora del IPAC YSTH2, y a todos los pocillos, menos al control de crecimiento, se les añadió RC a una concentración de 3.13 μ g/mL para poner en marcha al circuito IPAC e inducir la inhibición del crecimiento celular. Se eligió esta concentración de RC por ser la mínima capaz de inhibir el crecimiento de la cepa con el IPAC. Además, se añadió un control de inhibición del crecimiento de las células con RC y sin ningún compuesto.

Los valores de cada pocillo, una vez restado el del blanco con medio y RC y sin células, se normalizaron frente al crecimiento registrado en el control de crecimiento sin RC y sin compuesto, y se calculó el % de recuperación del crecimiento.

Se consideraron como compuestos positivos aquellos capaces de revertir el crecimiento celular como mínimo un 25% en al menos dos de las cuatro réplicas realizadas. Los valores de estos compuestos positivos en cada rastreo se recogen en la Tabla III del Anexo I.

12. PCR de transcripción reversa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)

Las condiciones de cultivo de las células para este experimento difieren ligeramente del detallado en el apartado 6, porque, durante la incubación nocturna que se hizo a 24 °C, el cultivo no debía alcanzar en ningún momento la fase estacionaria. Al día siguiente, se ajustaron las suspensiones celulares a una D.O._{600 nm} de 0.2 y se dejaron crecer 2 h más a 24 °C, antes de estimular las células con 30 µg/mL de RC o 10 mg/mL de sulfato de neomicina. Tras 1 y 4 h de tratamiento, el volumen de cultivo recogido fue de 5 mL. Se recogieron células sin tratar a estos mismos tiempos como control negativo. Se hicieron triplicados biológicos independientes por cada condición experimental.

La extracción del RNA se hizo con el sistema comercial *Macherey-Nagel Nucleospin Mini Kit* (*Macherey-Nagel*), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, la concentración y pureza del RNA extraído se determinó midiendo su absorbancia a 260 nm en el *NanoDropTM 2000c* (*Thermo Fisher Scientific*).

El resto del proceso se realizó en la Unidad de Genómica de la UCM, que volvieron a comprobar la calidad de las muestras por cromatografía capilar utilizando el equipo *Nano Bioanalyzer 2100B* (*Agilent Technologies*), previamente a la síntesis del cDNA a partir de 2 µg de RNA por transcripción inversa con el kit *AS Transcription System* (*Promega*). Las condiciones de la reacción de retrotranscripción fueron de 45 min a 42 °C, 5 min a 95 °C y 5 min a 4 °C, y el cDNA resultante se diluyó 1:100 con agua *Milli-QTM*, para realizar a continuación la PCR cuantitativa a tiempo real por duplicado en placas de 384 pocillos, con 4.5 µL de cDNA, 5 µL de la sonda *Power SYBRTM Green PCR Master MIX* (*Applied Biosystems*) y 0.6 µL del par de cebadores específicos a 5 µM. Las RT-qPCRs se llevaron a cabo en el equipo *7900HT Fast Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems*), y las condiciones de reacción consistieron en 1 ciclo de 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 min a 95 °C, y 1 min a 60 °C. Para cada gen amplificado, se realizó un análisis de curvas de disociación con el fin de descartar la presencia de productos inespecíficos en la reacción. La expresión de los resultados obtenidos se llevó a cabo normalizando los valores del gen *MLPI* con respecto al gen control *ACT1*, cuya expresión es constitutiva, y los ratios de expresión diferencial se calcularon siguiendo el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ descrito por Livak and Schmittgen, 2001.

Los oligonucleótidos empleados en este experimento se detallan en la Tabla 5, y fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Javier Arroyo del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM.

13. Microscopía de fluorescencia

13.1. Microscopía de fluorescencia para el análisis del reportero transcripcional pSTL1-YFP

Para el estudio de la expresión del reportero transcripcional de la ruta HOG pSTL1-YFP, se cultivaron las células que presentan esta construcción integrada en su genoma en medio SD completo a 30°C con agitación durante la noche, y a la mañana siguiente, se llevaron los cultivos a fase de crecimiento exponencial como se indica en el apartado 6. Para realizar experimentos de microscopía de fluorescencia, es importante que los cultivos presenten una D.O. $_{600\text{ nm}}$ baja (0.05-0.3) con tal de minimizar la autofluorescencia, especialmente la proveniente de la vacuola (Colman-Lerner *et al.*, 2005; Gordon *et al.*, 2007).

En este momento, se estimularon las células con 100 µg/mL de SDS, a excepción del control sin tratamiento (tiempo 0), y se frenó la traducción con 50 µg/mL de cicloheximida (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010) a los tiempos especificados (30, 60, 120 y 180 min). Después, se dejó que las proteínas fluorescentes madurasen durante toda la noche a 4 °C (Colman-Lerner *et al.*, 2005). Antes de tomar fotos con el microscopio de fluorescencia, se pasaron las células, previamente tratadas suavemente con el sonicador para promover la separación de las células agrupadas, a una placa de microscopía de 384 pocillos con fondo de vidrio (0.17 mm) tratada con concanavalina A (1 mg/mL), para que las células se adhieran al fondo tras una breve centrifugación de la placa. La concanavalina A es una lectina que se une a los azúcares de la pared de la levadura, lo cual impide que las células se muevan en el transcurso del experimento (Colman-Lerner *et al.*, 2005).

El microscopio de fluorescencia empleado en este trabajo fue un microscopio invertido *Olympus IX81* (*Olympus Life Science*). Más concretamente, se utilizó un objetivo de inmersión en aceite *PlanApo* con un aumento de 60X (*Olympus Life Science*). El microscopio está equipado con iluminación *CoolLED*, una platina motorizada en XYZ (*Prior Scientific*) y una cámara refrigerada *CCD CoolSnapHQ2* (*Photometrix*). Asimismo, posee un sistema de enfocado automático por láser infrarrojo (*Olympus ZDC Zero Drift autofocus*), que permite realizar adquisiciones totalmente automatizadas. Para tomar las imágenes y controlar el microscopio, se usó el programa *MetaMorph 7.5* (*Universal Imaging*

Corporation). Se seleccionaron dos campos diferentes por cada pocillo, y se obtuvieron las fotos en campo claro y en los canales de fluorescencia correspondientes.

Para extraer información cuantitativa de las imágenes de microscopía, estas fueron procesadas con el programa *Cell-ID* (Bush *et al.*, 2012; Gordon *et al.*, 2007). Este programa delimita las células a partir de la imagen de campo claro y extrae parámetros en base a la forma y fluorescencia detectada en los distintos canales, como el área y la fluorescencia total dentro de cada célula.

La información contenida en la tabla de datos proporcionada por *Cell-ID* se analizó con R (<http://www.r-project.org>) y el paquete *Rcell* diseñado específicamente para este objetivo (<http://cran.rproject.org/web/packages/Rcell/index.html>), y se calcularon diferentes parámetros poblacionales, como la media o la desviación estándar de cada variable. El gráfico que refleja los resultados del experimento de microscopía de fluorescencia fue generado con el paquete *ggplot2* de R.

13.2. Determinación de la localización subcelular de Hog1-Venus

La localización en el interior celular de la MAPK Hog1 se llevó a cabo empleando una cepa que presenta integrada una construcción de la quinasa fusionada a la proteína fluorescente Venus (Hog1-Venus).

En este experimento, las células se cultivaron como en el apartado 13.1, pero no se trataron con cicloheximida tras el tratamiento con NaCl 0.8 M o con 100 µg/mL de SDS, sino que se tomaron las imágenes de microscopía al momento. De hecho, como los tiempos de exposición a estos agentes estresantes eran tan cortos (15 min para NaCl y 2, 20 y 120 min para SDS), se estimuló a las células en la propia placa de microscopía, previamente adheridas a la misma gracias al tratamiento de la placa con concanavalina A, y los dos campos de cada pocillo se eligieron antes de la estimulación celular.

Todos los experimentos de microscopía fueron realizados en el laboratorio del Dr. Alejandro Colman-Lerner en el centro de investigación IFIBYNE (Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias), perteneciente a la Universidad de Buenos Aires (UBA) y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) de Argentina.

14. Soporte bioinformático

Se han consultado diferentes bases de datos y se han utilizado diversas herramientas bioinformáticas en este trabajo. Las más utilizadas han sido las siguientes:

- **PubMed**. Repositorio digital de artículos publicados en revistas científicas del ámbito de la biomedicina y ciencias de la vida, desarrollado por el NCBI (*Nacional Center of Biotechnology Information*). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- **Saccharomyces Genome Database (SGD)**. Servidor de la Universidad de Stanford que proporciona información biológica integrativa de la levadura *S. cerevisiae* con acceso a herramientas de búsqueda y análisis para la exploración de estos datos. <http://www.yeastgenome.org/>
- **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)**. Permite la búsqueda de similitudes entre las secuencias de DNA y de proteínas y las secuencias disponibles en las bases de datos, y fue desarrollado por el NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>
- **GeneRunner**. Programa que permite visualizar, analizar y editar secuencias de nucleótidos y aminoácidas, así como determinar las enzimas de restricción que cortan o no una determinada secuencia, o el diseño de cebadores.
- **Oligo Analyzer**. Permite analizar las características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación por PCR de una secuencia de DNA determinada.
- **ORF Finder**. Permite conocer todos los posibles marcos de lectura de una secuencia de DNA concreta.
- **ImageJ**. Programa de procesamiento de imagen digital de dominio público desarrollado por el NIH (*National Institutes of Health*).
- **RStudio**. Entorno de desarrollo integrado para el lenguaje de programación R, dedicado a la computación estadística y gráficos.
- **Mendeley**. Programa de gestión de bibliografía, referencias y citas.

RESULTADOS

1. Caracterización del circuito genético sintético de amplificación de la señal de la ruta de integridad celular o IPAC (*Integrity Pathway Activation Circuit*)

1.1. El circuito IPAC promueve la inhibición del crecimiento de manera dependiente de la activación de Rlm1

En primer lugar, para ver el efecto fenotípico de la introducción del circuito IPAC (Figura 10A) en las células de levadura, se llevó a cabo un ensayo de crecimiento de células transformadas con un plásmido centromérico que porta esta construcción genética.

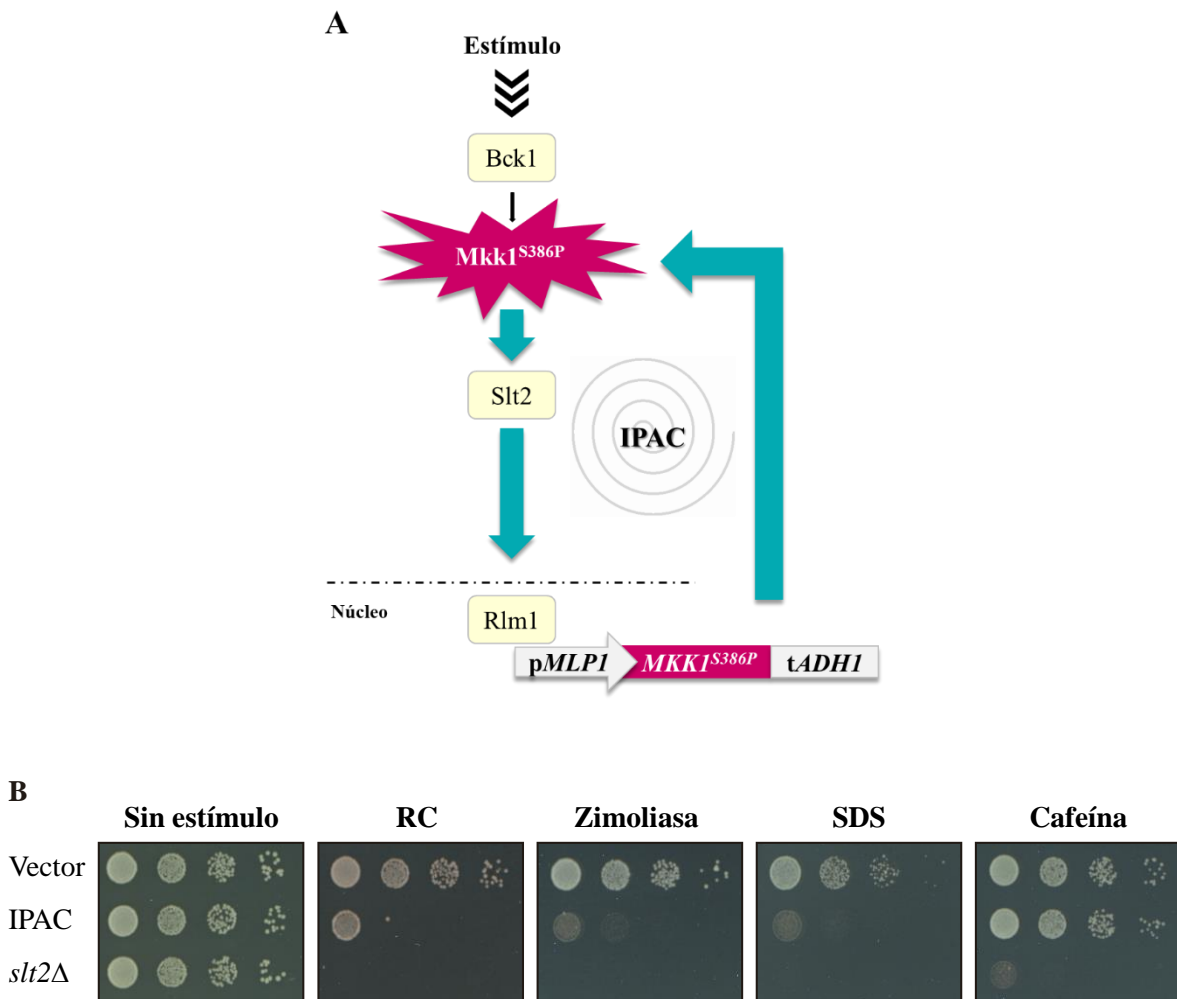


Figura 10. (A) Esquema del circuito genético sintético de amplificación de la señal de la ruta de integridad celular o IPAC. (B) Ensayo de sensibilidad en placa a diferentes estímulos de la ruta CWI de la cepa silvestre BY4741 transformada con el vector vacío YCplac111 (Vector) o YCplac111-IPAC (IPAC) y de la cepa isogénica *slt2Δ* portando el vector vacío. Diluciones decimales seriadas de las distintas cepas se sembraron en placas de medio SD Leu- pH 6.5 en ausencia o presencia de 3 µg/mL de RC, 5 U/mL de zimoliasa, 100 µg/mL de SDS o 4 mM de cafeína, y se incubaron a 30 °C durante 48 h.

La sobreexpresión del alelo hiperactivo *MKK1^{S386P}* conlleva la muerte celular (Watanabe *et al.*, 1995), por lo que las células portadoras del IPAC mostraron hipersensibilidad frente a diferentes estreses que estimulan esta ruta, como el rojo Congo, la zimoliasa y el SDS, a concentraciones subinhibitorias para la cepa silvestre, como consecuencia de la puesta en marcha del circuito y la subsecuente amplificación de la señal (Figura 10B), como había sido descrito previamente por nuestro grupo (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020b). Sin embargo, en el caso de la cafeína, el circuito no provoca inhibición del crecimiento, lo que confirma tanto que la respuesta inducida por este compuesto no depende del factor de transcripción Rlm1 (Kuranda *et al.*, 2006), como que el IPAC solo se dispara si el estímulo promueve la respuesta transcripcional dependiente de este factor de transcripción. Cabe destacar también que en las condiciones ensayadas la hiperactivación de la ruta CWI provocada por el IPAC es menos deletérea para la célula que la falta total de señalización por esta ruta en un mutante *slt2Δ*, como se muestra en la Figura 10B.

1.2. El circuito IPAC induce incrementos en la fosforilación de Slt2 y activación transcripcional de manera dependiente de la intensidad del estímulo

Generalmente, la hiperactivación de una ruta de señalización mediada por MAPKs se traduce en una hiperfosforilación de la MAPK implicada en la misma. Con el objetivo de caracterizar la respuesta generada por el IPAC al nivel de la MAPK de la ruta, se analizó la dinámica de fosforilación de Slt2 bajo distintas intensidades de estimulación, es decir, a concentraciones crecientes (1, 5, 30 y 180 µg/mL) del agente estresante de la pared celular RC.

Como se puede observar en la Figura 11, independientemente del circuito, a la mínima concentración de RC, la cantidad de Slt2 activada alcanzó el pico a las 8 h, mientras que a concentraciones más altas la fosforilación de Slt2 logró el máximo nivel a tiempos más cortos, entre las 2 y las 4 h. Por otro lado, en ausencia del circuito, la máxima activación de la MAPK varía desde un incremento del doble tras el tratamiento con 1 µg/mL de RC hasta ocho veces con 180 µg/mL de RC, mientras que el circuito incrementó significativamente la cantidad de Slt2 fosforilada en todos los casos, como, por ejemplo, a 30 y 180 µg/mL de RC, donde indujo un incremento de 15 y 16 veces, respectivamente, sobre la fosforilación basal en las células sin circuito a tiempo 0. Por tanto, estos resultados indican que este circuito genético promueve un nivel de señalización elevado y sostenido a través de la ruta CWI.

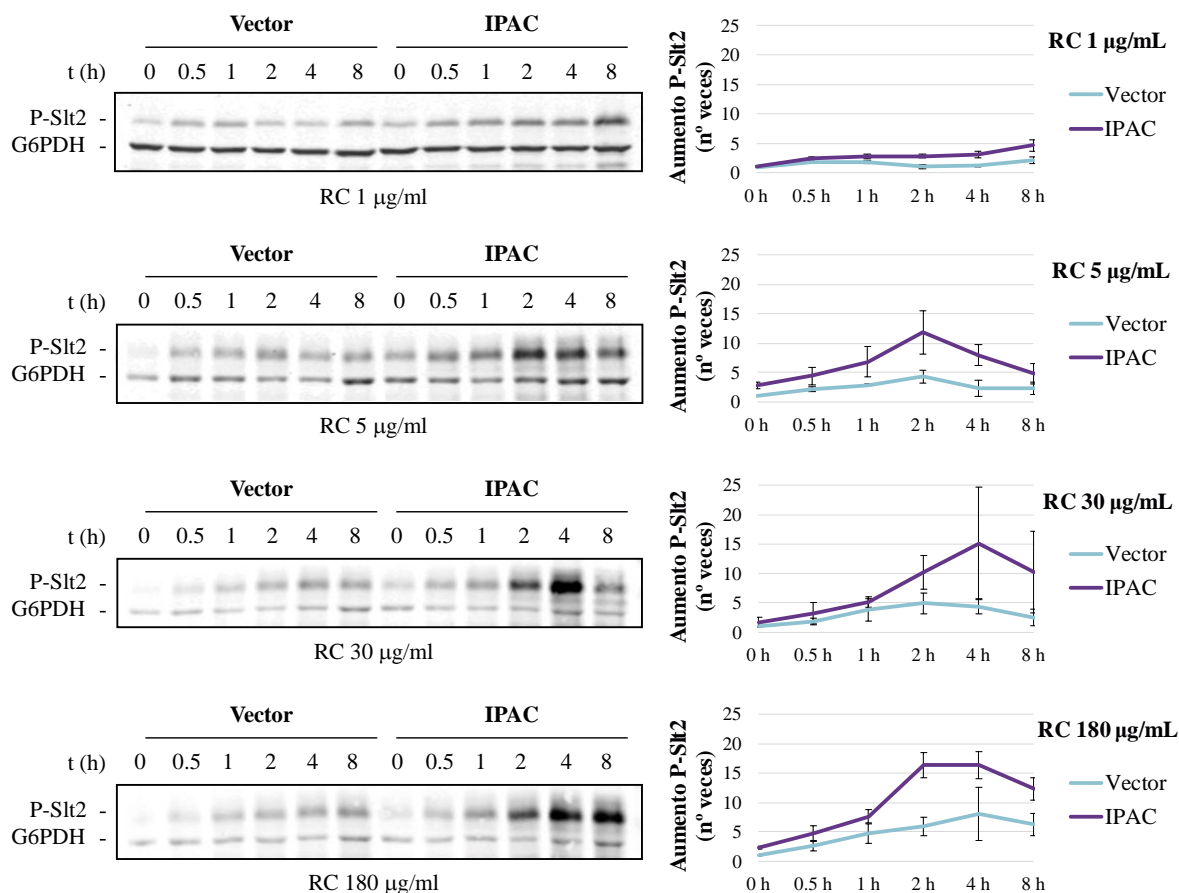


Figura 11. Análisis de la fosforilación de Slt2 en respuesta a RC mediante *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 transformada con el plásmido YCplac111 (Vector) o YCplac111-IPAC (IPAC). Las células se incubaron en medio YPD a 24 °C durante el tiempo y a las concentraciones de RC indicados. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. Las gráficas representan el incremento de fosforilación de Slt2 a lo largo del tiempo, a través de los valores medios procedentes de la cuantificación de la banda de fosforilación de Slt2 normalizados frente al control de carga y al nivel basal de la cepa con el vector vacío en ausencia de estrés. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres transformantes independientes.

Una vez conocido el efecto del IPAC sobre la dinámica de fosforilación de Slt2, se valoró su influencia sobre el nivel de activación transcripcional de la ruta dependiente del factor de transcripción Rlm1. Para ello, se empleó un sistema reportero basado en la expresión de la enzima β -galactosidasa a partir del gen *lacZ* controlada por el promotor de *MLP1*, uno de los genes modulados por Rlm1 que más se inducen en condiciones de activación de la ruta CWI (García *et al.*, 2004). Consecuentemente, a mayor actividad transcripcional de la ruta, mayor actividad β -galactosidasa.

RESULTADOS

Al igual que en el caso de los niveles de fosforilación de Slt2, la expresión del reportero transcripcional promovida por la exposición a RC es notablemente mayor cuando se activa el IPAC en comparación con la ausencia de compuesto (Figura 12). Además, la diferencia en la activación transcripcional de la ruta CWI de las células portadoras del IPAC y de las que solo tienen el vector vacío es dependiente de la concentración del agente estresante, alcanzándose el valor máximo a partir de 30 $\mu\text{g/mL}$ de RC, como ocurría con la fosforilación de Slt2.

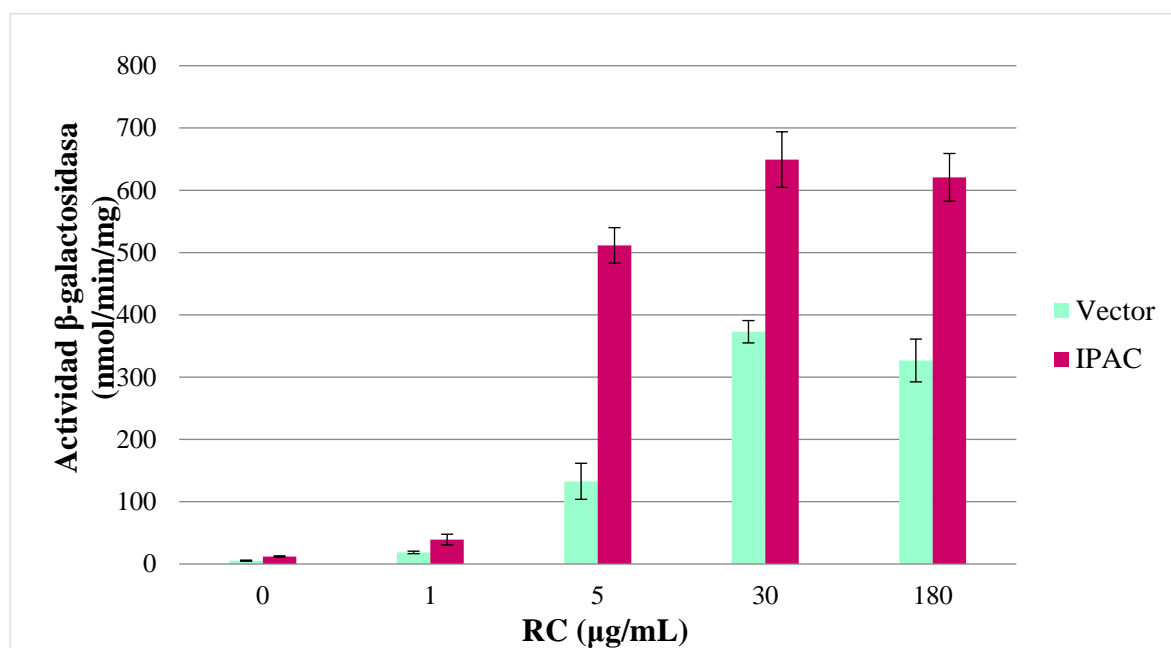


Figura 12. Determinación de la actividad transcripcional de la ruta CWI en respuesta a RC mediante la medida de la actividad β -galactosidasa de los extractos celulares de la cepa BY4741 co-transformada con el plásmido YEp352-pMLP1-lacZ y el vector vacío YCplac111 (Vector) o YCplac111-IPAC (IPAC). Las células se sometieron al tratamiento con RC a las concentraciones indicadas durante 4 h en medio YPD y a 24 °C. Los datos representan la actividad β -galactosidasa media de tres transformantes independientes, y las barras de error indican la desviación estándar.

1.3. La integración genómica del IPAC en la cepa Y3656 genera una mayor hiperactivación de la ruta CWI y una mayor sensibilidad a zimoliasa

Adicionalmente a las versiones plasmídicas del circuito, se generó una versión del IPAC integrada en el genoma de la cepa de levadura Y3656. Esta modalidad dio lugar a un fenotipo de sensibilidad a zimoliasa más pronunciado que la introducción del circuito en las células transportado en un plásmido centromérico (Figura 13). Igualmente, la fosforilación de Slt2 en respuesta a RC también es mayor (algo más del doble) en el caso del IPAC integrado en comparación con el IPAC en plásmido (Figura 14), lo que demuestra una hiperactivación de

la ruta aún más acusada inducida por el IPAC integrado. Sin embargo, ambas versiones provocan una misma cinética de activación de Slt2 (Figura 14).

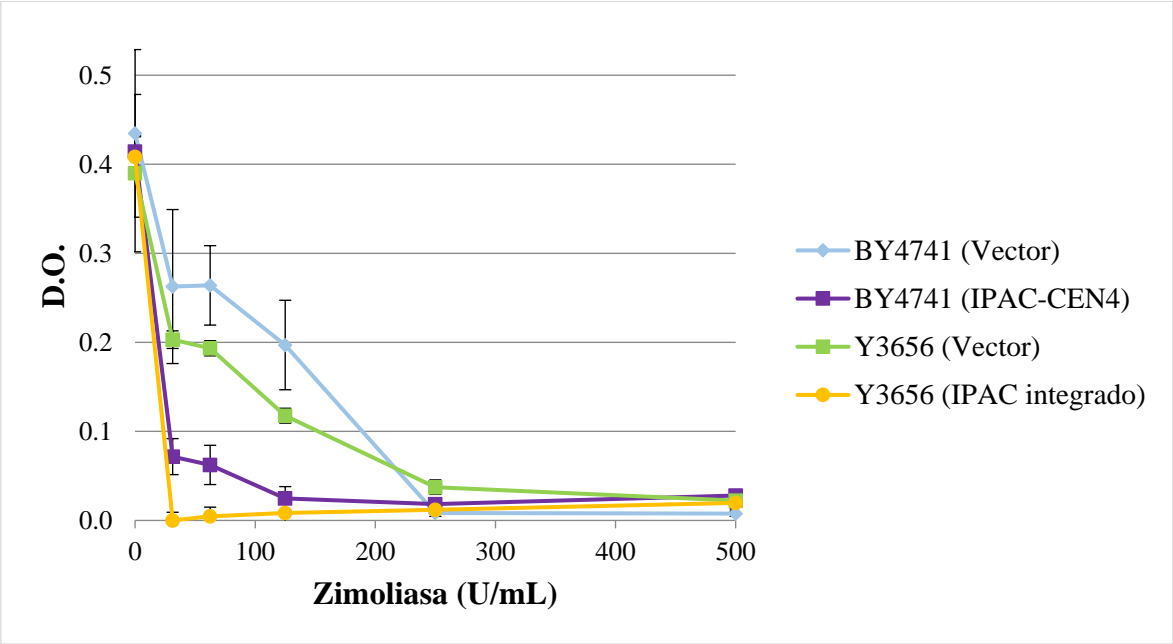


Figura 13. Ensayo de sensibilidad a zimoliasa en placa multipocillo de las cepas BY4741 transformada con el vector vacío YCplac111 (Vector) o con el plásmido YCplac111-IPAC (IPAC-*CEN4*), YSTH1 (Y3656 (Vector)) e YSTH2 (Y3656 (IPAC integrado)). Las células se incubaron en medio YPD a 30 °C durante 12.5 h. Los datos de densidad óptica (D.O.) de los cultivos se corresponden con la media de tres transformantes independientes, y las barras de error representan la desviación estándar.

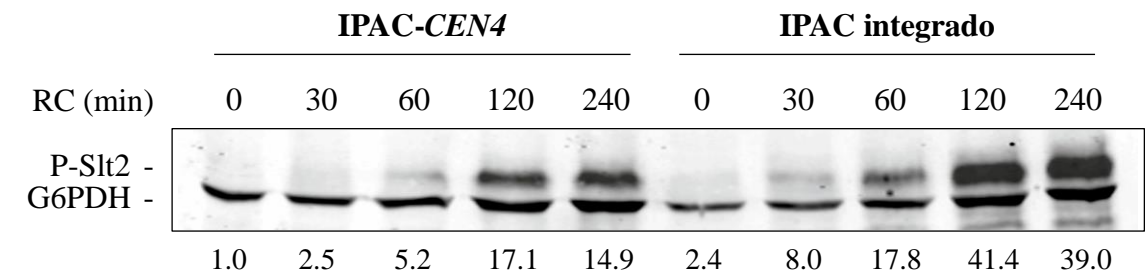


Figura 14. Determinación de la fosforilación de Slt2 mediante *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 transformada con el plásmido YCplac111-IPAC (IPAC-*CEN4*) y de la cepa YSTH2 (IPAC integrado) tratadas con 30 µg/mL de RC en medio YPD y a 30 °C durante los tiempos indicados. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. Los números de la parte inferior muestran la cantidad de Slt2 fosforilada normalizada con respecto al control de carga y al nivel de fosforilación en ausencia de estímulo de la muestra del IPAC-*CEN4*.

RESULTADOS

Siguiendo la misma línea, y para confirmar que la mayor actividad de Slt2 inducida por el IPAC integrado se traduce en una mayor actividad transcripcional, se realizó un ensayo de determinación de la actividad β -galactosidasa para estudiar la inducción del reportero *pMLP1-lacZ* a causa del tratamiento de las células con RC, que volvió a ser más alta (prácticamente el doble) para el circuito integrado que para el IPAC plasmídico (Figura 15). Destaca, por otro lado, la actividad transcripcional de la ruta en ausencia de estímulo que muestra la cepa Y3656 con el IPAC integrado.

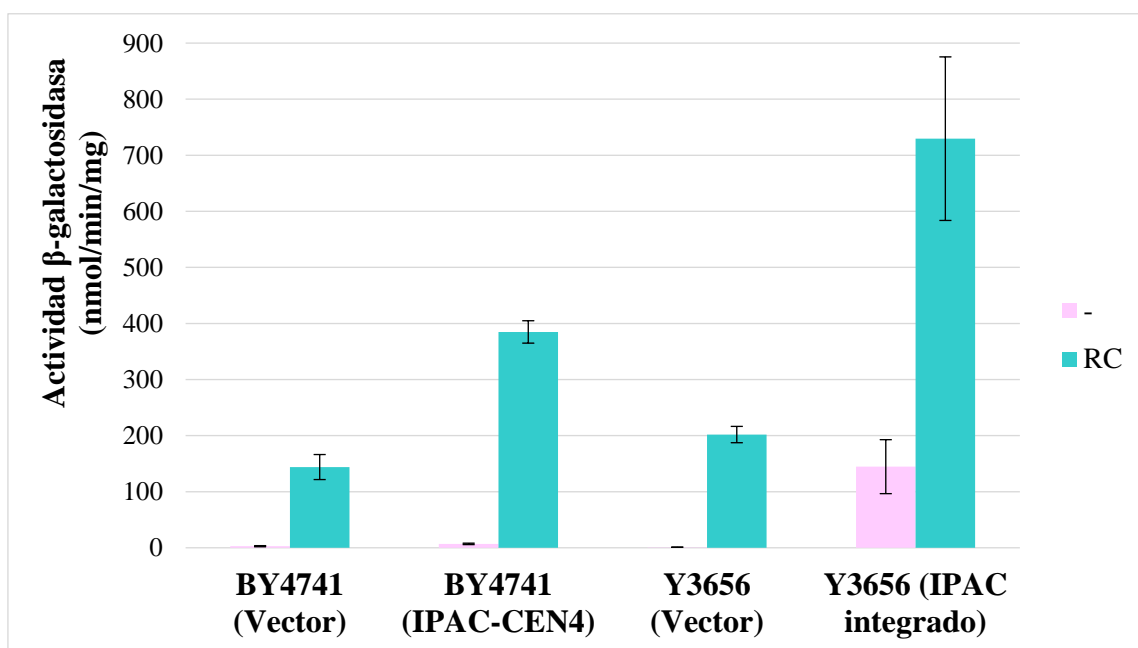


Figura 15. Cuantificación de la actividad β -galactosidasa en respuesta a RC de los extractos celulares de las cepas BY4741 transformada con el vector vacío YCplac111 (Vector) o con el plásmido YCplac111-IPAC (IPAC-CEN4), YSTH1 (Y3656 (Vector)) e YSTH2 (Y3656 (IPAC integrado)), todas transformadas a su vez con el plásmido YEp352-*pMLP1-lacZ*. Las células se incubaron con 30 μ g/mL de RC o en ausencia de estímulo (-) durante 4 h en medio YPD y a 24 °C. Los datos representan la media de tres transformantes independientes, y las barras de error indican la desviación estándar.

1.4. La presión selectiva del medio es necesaria para que el IPAC portado en un plásmido centromérico genere sensibilidad a compuestos que alteran la pared celular

Con el fin de esclarecer las causas de la diferente potencia de las versiones del circuito en la amplificación de la señalización de la ruta CWI, se comparó el crecimiento de las células con las dos modalidades del circuito, en plásmidos centroméricos (YCplac111 y pHR70) o integrado en el genoma, en distintos medios y con varios estímulos de la ruta. Como se puede observar en la Figura 16, la eficacia fenotípica del IPAC en el plásmido pHR70 (*URA3*) es prácticamente imperceptible en los medios que contienen uracilo, como el medio rico YPD

o el medio sintético SD completo, a diferencia del IPAC integrado, que provoca la inhibición del crecimiento celular en todas las condiciones de cultivo de estrés de pared ensayadas.

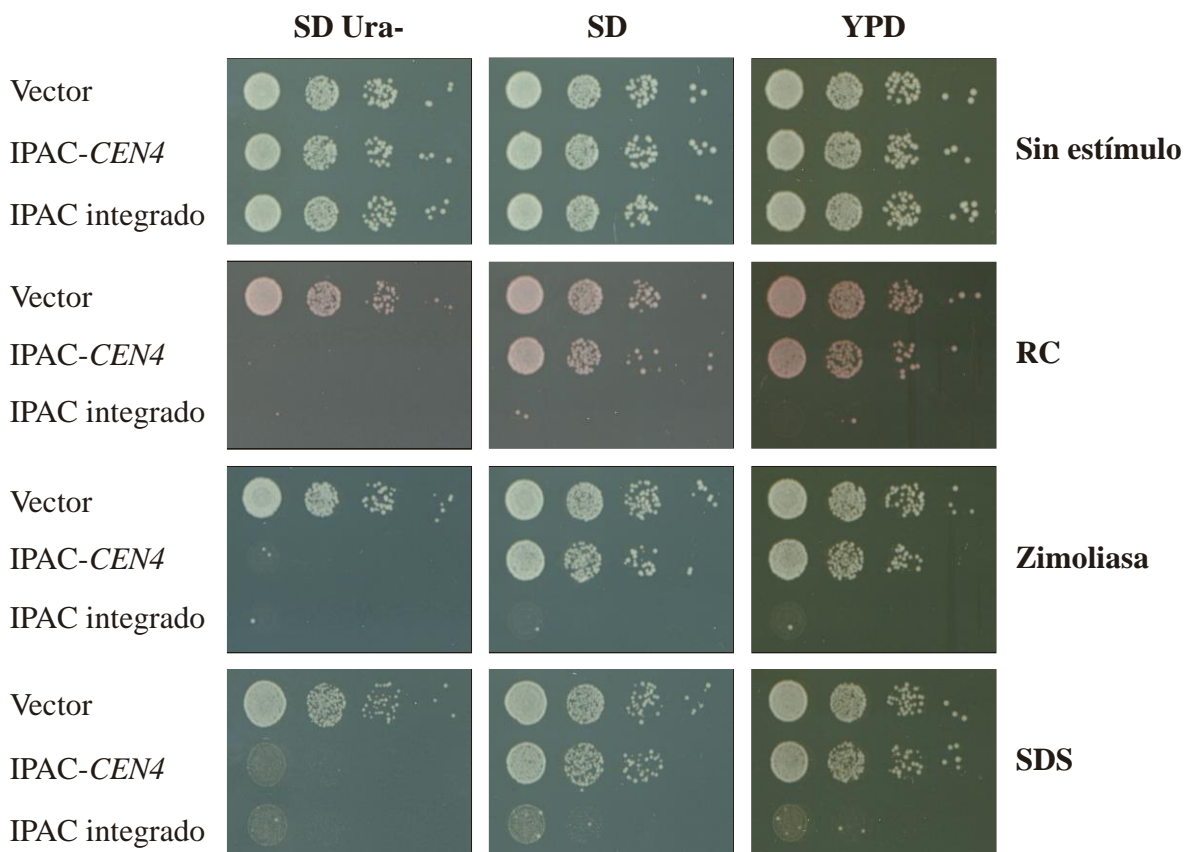


Figura 16. Ensayo de sensibilidad en placa a distintos estímulos de la ruta CWI de las cepas YSTH1 transformada con el vector vacío pHR70 (Vector) o con el plásmido pHR70-IPAC (IPAC-*CEN4*) e YSTH2 (IPAC integrado). Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de medio SD Ura- pH 6.5, SD completo pH 6.5 o YPD, en ausencia o presencia de 5 µg/mL de RC, 10 U/mL de zimoliasa o 100 µg/mL de SDS. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

En el caso del IPAC incluido en el vector YCplac111 (*LEU2*), a pesar de que sí que muestra algo de inhibición del crecimiento en medios sin presión selectiva, es mucho más potente el efecto de este circuito plasmídico en el medio sin leucina (Figura 17). No obstante, en los medios con presión selectiva, la capacidad del IPAC en los plásmidos centroméricos para inhibir el crecimiento celular es la misma que la del IPAC integrado. Esto sugiere que la presión selectiva es esencial para la completa funcionalidad del circuito en sus versiones plasmídicas y la consecuente presentación de fenotipo de inhibición del crecimiento.

RESULTADOS

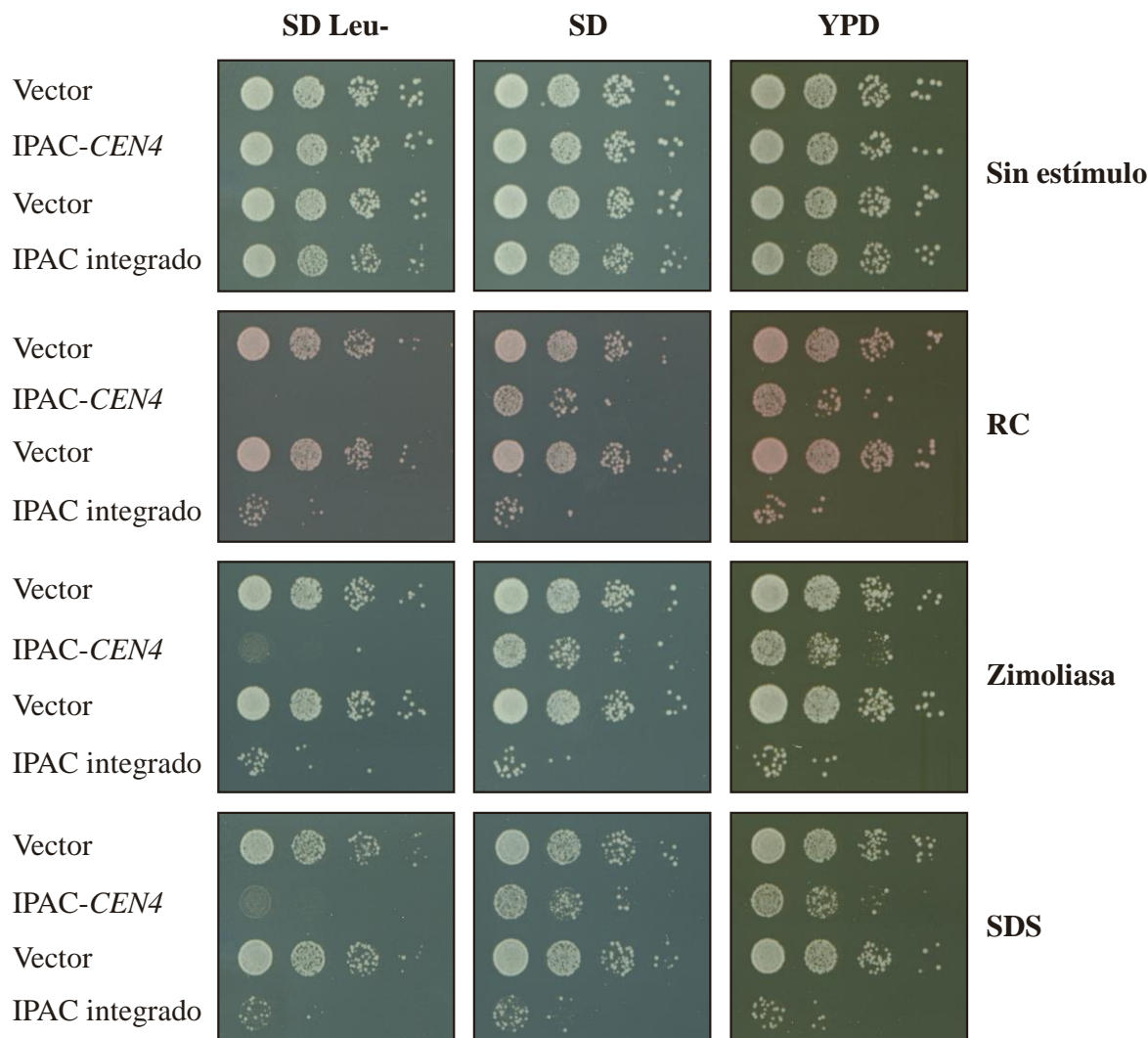


Figura 17. Ensayo de sensibilidad en placa a distintos estímulos de la ruta CWI de las cepas BY4741, transformada con el vector vacío YCplac111 (Vector) o con el plásmido YCplac111-IPAC (IPAC-*CEN4*), YSTH1 (Vector) e YSTH2 (IPAC integrado). Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de medio SD Leu- pH 6.5, SD completo pH 6.5 o YPD, en ausencia o presencia de 5 µg/mL de RC, 10 U/mL de zimoliasa o 100 µg/mL de SDS. Las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Una posible explicación de la debilidad del efecto inhibitorio del IPAC en los plásmidos centroméricos en medios completos podría ser que se estuviera activando menos el circuito bajo estas condiciones. Sin embargo, en la Figura 18 se puede ver que el aumento de la fosforilación de Slt2 en respuesta a RC tras 4 h de incubación en las células portadoras del IPAC en el vector YCplac111 es similar en los medios completo y selectivo, ya que los niveles de fosfo-Slt2 alcanzados en ambas condiciones de cultivo son bastante similares. Por tanto, el circuito en su versión plasmídica responde a la estimulación por agentes inductores de estrés de pared independientemente del tipo de medio, si bien para la observación de la inhibición del crecimiento es necesario utilizar medios selectivos.

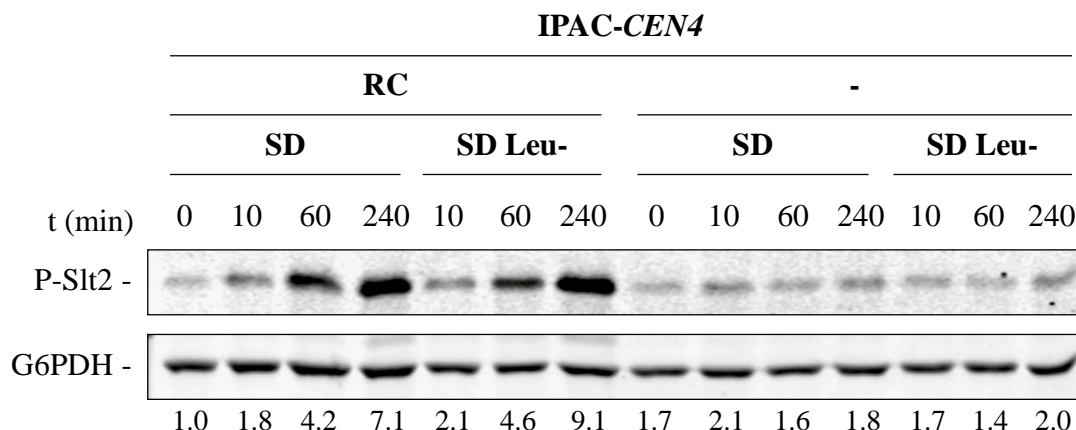


Figura 18. Análisis de los niveles de fosfo-Slt2 por *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 transformada con el plásmido YCplac111-IPAC e incubada en un medio completo o sin leucina. Se tomaron alícuotas a partir de un único cultivo a 24 °C en medio SD completo pH 6.5 antes (0) y después de resuspender las células en medio fresco SD completo o Leu- pH 6.5 con 5 µg/mL de RC o sin estímulo (-) a los tiempos señalados. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. Los números de la parte inferior muestran los valores de fosforilación de Slt2 normalizados frente al control de carga y a la fosforilación basal correspondiente a la muestra recogida antes de resuspender las células en medio fresco.

En conjunto, todos estos resultados respaldan la utilidad del IPAC como herramienta para la fácil identificación tanto de activadores como de reguladores negativos de la ruta CWI gracias a su elevada sensibilidad, ya que en la primera situación observaremos una inhibición del crecimiento por la activación del circuito, mientras que en el segundo escenario la reducción en la señalización de la ruta y, por tanto, del IPAC restaurará el crecimiento de la levadura.

2. Determinación de la implicación de las rutas de MAPKs CWI y HOG en la respuesta celular inducida por el detergente aniónico SDS

2.1. El detergente SDS da lugar a la activación del circuito debido a su naturaleza aniónica

El uso de detergentes como desestabilizantes de membranas biológicas está muy extendido. Sin embargo, existen múltiples moléculas de carácter anfipático con diferentes propiedades, por lo que pueden provocar distintos grados de alteración de la integridad celular en función de sus características. Por ello, se quiso comparar el efecto de tensioactivos no iónicos con el del SDS de naturaleza aniónica sobre las células de levadura portadoras del circuito.

En la Figura 19 se pone de manifiesto que solo el SDS es capaz de activar al IPAC e impedir el crecimiento celular, a diferencia de los detergentes neutros NP-40 y Tritón X-100 incluso

RESULTADOS

utilizados a concentraciones muy superiores, lo que sugiere que es la carga negativa del SDS la responsable de la activación del circuito y, por tanto, de la ruta CWI.

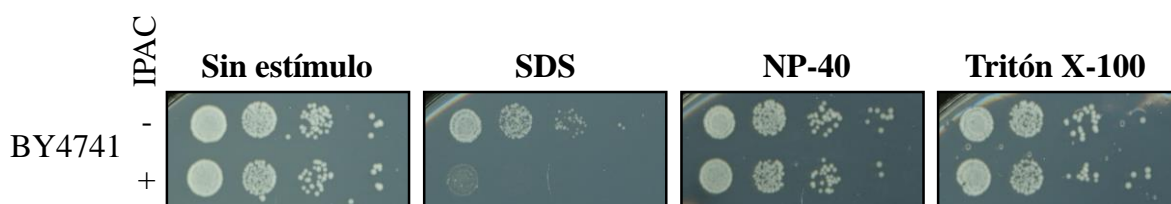


Figura 19. Ensayo de sensibilidad a detergentes en medio sólido de la cepa BY4741 transformada con los plásmidos pHR70 (-) o pHR70-IPAC (+). Las diluciones decimales seriadas se sembraron en placas de SD Ura- pH6.5 sin estímulo o con 100 µg/mL de SDS, 10 mg/mL de NP-40 o 10 mg/mL de tritón X-100, y las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

2.2. La señalización del SDS hacia Slt2 requiere la contribución conjunta de los módulos de MAPKs de las rutas CWI y HOG

Como se ha mencionado con anterioridad en el apartado de antecedentes, gracias a que el SDS activa al circuito y permite que se pueda usar el fenotipo de inhibición del crecimiento como reportero de la activación de la ruta CWI, se llevó a cabo un rastreo de mutantes de delección transformados con el IPAC inserto en el plásmido centromérico YCplac111 en el que se vio que la señalización del SDS llegaba al módulo de MAPKs de la ruta CWI a través del eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG. Para confirmar estos resultados, se hizo un nuevo ensayo de crecimiento con los mutantes que cortaron la señalización del circuito en presencia de SDS, pero esta vez transformados con el otro vector centromérico portador del IPAC (pHR70-IPAC), en presencia de SDS y de otros dos estímulos de la ruta CWI (RC y zimoliasa) (Figura 20). Además, se incluyó también a los mutantes en el módulo de MAPKs de la ruta CWI por ser necesarios para el crecimiento con SDS, al igual que a *rom2Δ* y a *sho1Δ* como controles específicos de corte de la señalización del RC y de la zimoliasa, respectivamente.

De este experimento cabe destacar, en primer lugar, la importancia de la integridad del circuito para su funcionalidad, ya que en el mutante *rlm1Δ* con el IPAC no se observa fenotipo inhibitorio alguno en presencia de ninguno de los tres estímulos, de acuerdo con el papel de Rlm1 en el mecanismo de activación del IPAC (Figura 20). Por otro lado, se confirma que los componentes del módulo de MAPKs de la ruta CWI, Bck1 y Slt2, son esenciales para el crecimiento de las células en condiciones de estrés inducido por cualquiera de los tres compuestos, si bien se observa un mayor efecto inhibitorio del IPAC con RC y

zimoliasa, probablemente por ser estos estímulos más potentes que el SDS sobre la ruta CWI (Figura 20). El mutante *rom2Δ* solo muestra una sensibilidad visiblemente mayor que la cepa silvestre en ausencia de IPAC con RC, como era de esperar. Sin embargo, es en presencia de este estímulo cuando este mutante es capaz de recuperar claramente el crecimiento de las células con el IPAC, indicativo de la interrupción de la señalización, al contrario de lo que ocurre en presencia de zimoliasa o de SDS (Figura 20). Por tanto, el hecho de que la ausencia de la GEF de Rho1 Rom2 no corte la señalización del SDS hace suponer que la entrada de la señalización al módulo de MAPKs no sucede de manera canónica vía esta GEF.

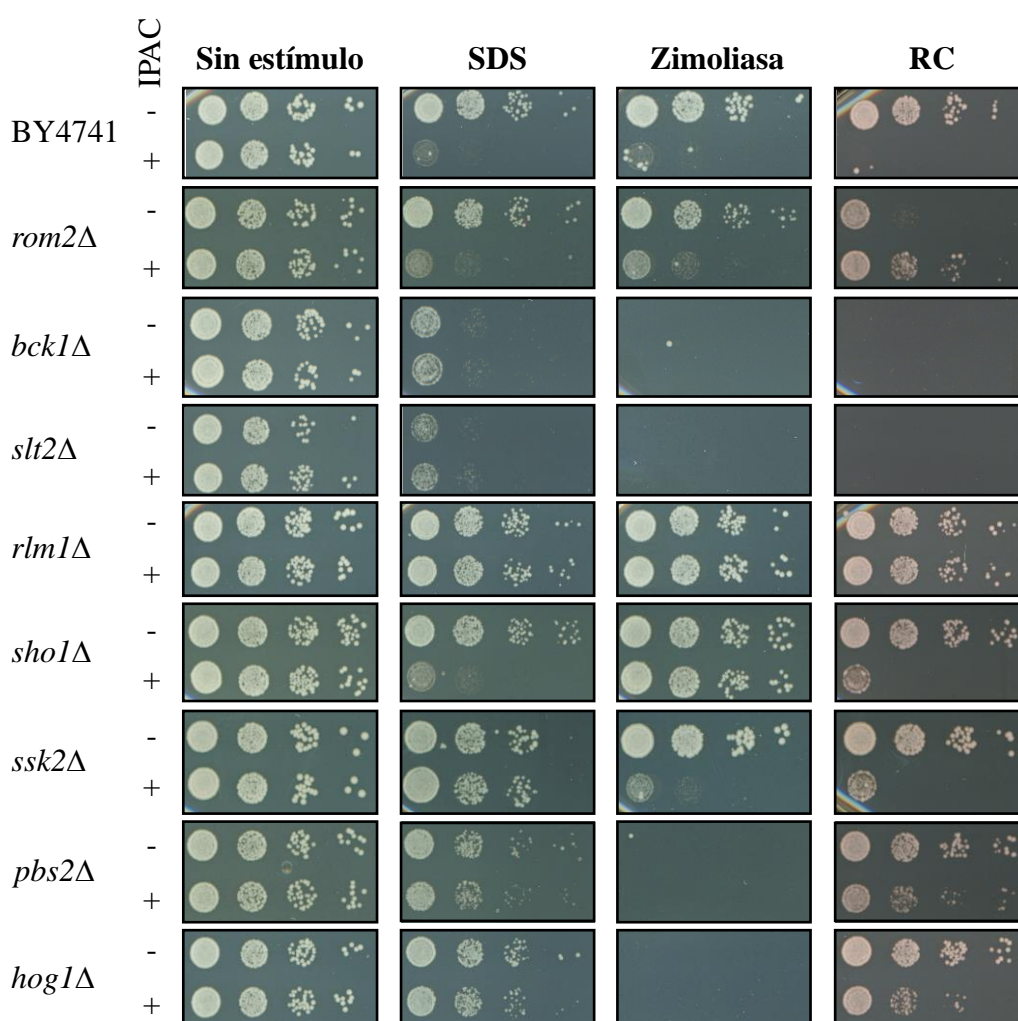


Figura 20. Ensayo de sensibilidad en placa a distintos estreses de la cepa silvestre BY4741 y de los mutantes isogénicos defectivos en los principales componentes de las rutas de señalización CWI y HOG indicados, transformados con el vector vacío pHR70 (-) o con el plásmido pHR70-IPAC (+). Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de medio SD Ura- pH 6.5 sin o con 100 µg/mL de SDS, 5 U/mL de zimoliasa o 5 µg/mL de RC, y las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Con respecto a la ruta HOG, ninguno de los mutantes en ausencia del IPAC son sensibles al tratamiento con SDS (Figura 20). Mientras que el mutante *sho1Δ* solo promueve el crecimiento de las células con el IPAC en zimoliasa, en concordancia con el papel fundamental de este osmosensor en la respuesta celular frente a este agente estresante (Bermejo *et al.*, 2008), la quinasa Ssk2 contribuye en gran medida a la señalización del SDS por la ruta de integridad, como se deduce de la total recuperación del crecimiento del mutante *ssk2Δ* en presencia del IPAC, lo cual no ocurre ni con RC ni con zimoliasa. Asimismo, este efecto restaurador del crecimiento en presencia de SDS se observa también en los mutantes *pbs2Δ* y *hog1Δ*, al igual que con RC, aunque en menor medida, mientras que con zimoliasa el crecimiento de estos mutantes es nulo, tanto en las células portadoras como no portadoras del circuito (Figura 20), dado el papel esencial de Pbs2 y Hog1 en la respuesta a este tratamiento (Bermejo *et al.*, 2008). Por tanto, se confirma también que para que la señalización del SDS llegue hasta Slt2 es necesaria la contribución del módulo de MAPKs de la rama SLN1 de la ruta HOG, pero no del osmosensor Sho1.

2.3. El eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG permite la activación del módulo de MAPKs de la ruta CWI en respuesta a SDS

El circuito IPAC es una herramienta sintética que permite poner en evidencia diferencias sutiles que pueden pasar desapercibidas si no están amplificadas de alguna forma. No obstante, una vez identificados estos matices, trabajar sin el circuito refleja una situación más fisiológica. En consecuencia, y una vez determinada la conexión entre las rutas HOG y CWI en respuesta a SDS, se decidió profundizar en la señalización de los módulos de MAPKs de estas rutas en ausencia del IPAC. Con este objetivo, se analizó la cinética de activación de Slt2 por exposición celular a SDS y cómo influía en ella la falta de los elementos del módulo de MAPKs de la ruta HOG Ssk2, Pbs2 y Hog1.

En el análisis de la fosforilación de Slt2 inducida por SDS a lo largo del tiempo, se observó la existencia de dos tipos de respuesta, una rápida y transitoria, que presenta un pico de fosforilación de Slt2 al minuto, y una más lenta y prolongada, cuyo pico de fosforilación se alcanza entre los 120 y 240 minutos de exposición al detergente (Figura 21). Además, de la comparación de la cepa silvestre con los mutantes *ssk2Δ*, *pbs2Δ* y *hog1Δ* se deduce que tanto Ssk2 como Pbs2 y Hog1 estarían actuando en la segunda respuesta a tiempos largos de exposición, ya que su falta reduce el nivel de fosforilación de Slt2 alcanzado por la cepa silvestre en estas condiciones, mientras que la respuesta rápida en estos mutantes es muy

parecida al de la cepa silvestre en cuanto al incremento de fosforilación de esta MAPK observado tras 1 minuto de exposición.

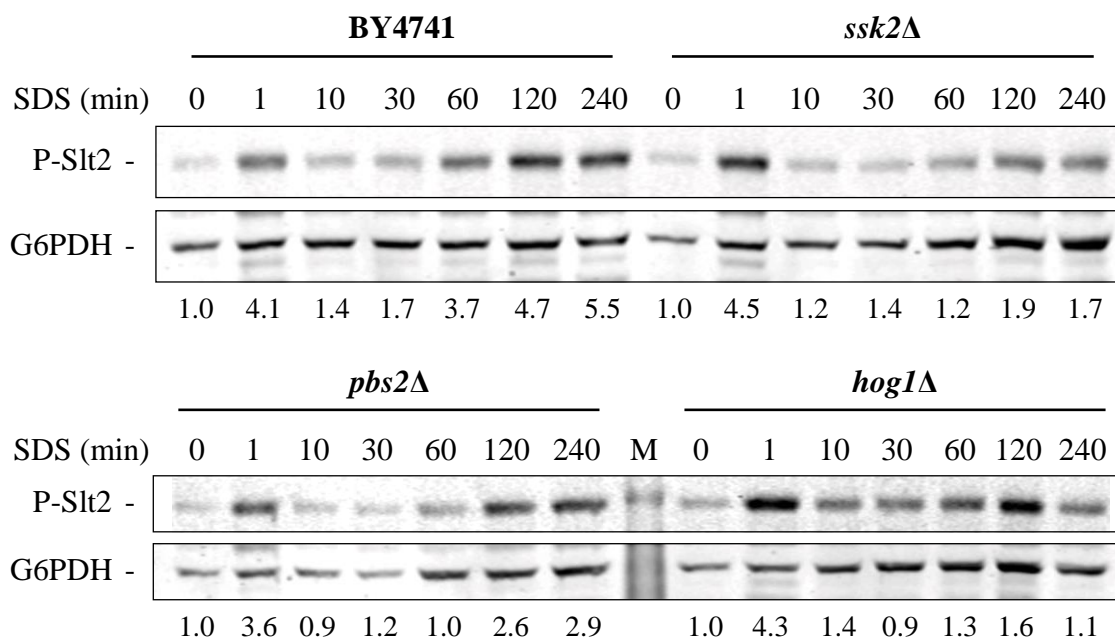


Figura 21. Estudio de la cantidad de fosfo-Slt2 en respuesta a SDS por *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 y de los mutantes isogénicos *ssk2Δ*, *pbs2Δ* y *hog1Δ*. Las células se cultivaron en YPD a 30 °C y se trataron con 100 µg/mL de SDS durante los tiempos indicados. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. Los números de la parte inferior muestran los valores de fosforilación de Slt2 normalizados frente al control de carga y a la fosforilación basal correspondiente a la ausencia de estímulo. La 'M' hace referencia al marcador de pesos moleculares.

Igualmente, la implicación del eje Ssk2-Pbs2-Hog1 en la señalización del SDS por la ruta CWI se puso de manifiesto a nivel transcripcional en el ensayo de determinación de actividad β -galactosidasa detallado anteriormente. Como se observa en la Figura 22, la carencia de Ssk2 o de Hog1 reduce drásticamente la expresión de *pMLPI-lacZ* mediada por Rlm1 y estimulada por SDS, en consonancia con la recuperación del crecimiento que ocurre en las células con IPAC (Figura 22). En la cepa silvestre, el SDS induce en menor medida la expresión de este reportero transcripcional si se compara con los niveles alcanzados durante la estimulación con RC. No obstante, mientras que la reducción en la expresión inducida por SDS en los mutantes *ssk2Δ* y *hog1Δ* es muy similar, en el caso del RC solo *hog1Δ* disminuye la actividad transcripcional de la ruta CWI dependiente de Rlm1 de manera significativa (Figura 22). Esta reducción es parcial y concuerda con la recuperación también parcial del crecimiento en RC del mutante *hog1Δ* en presencia del IPAC (Figura 20).

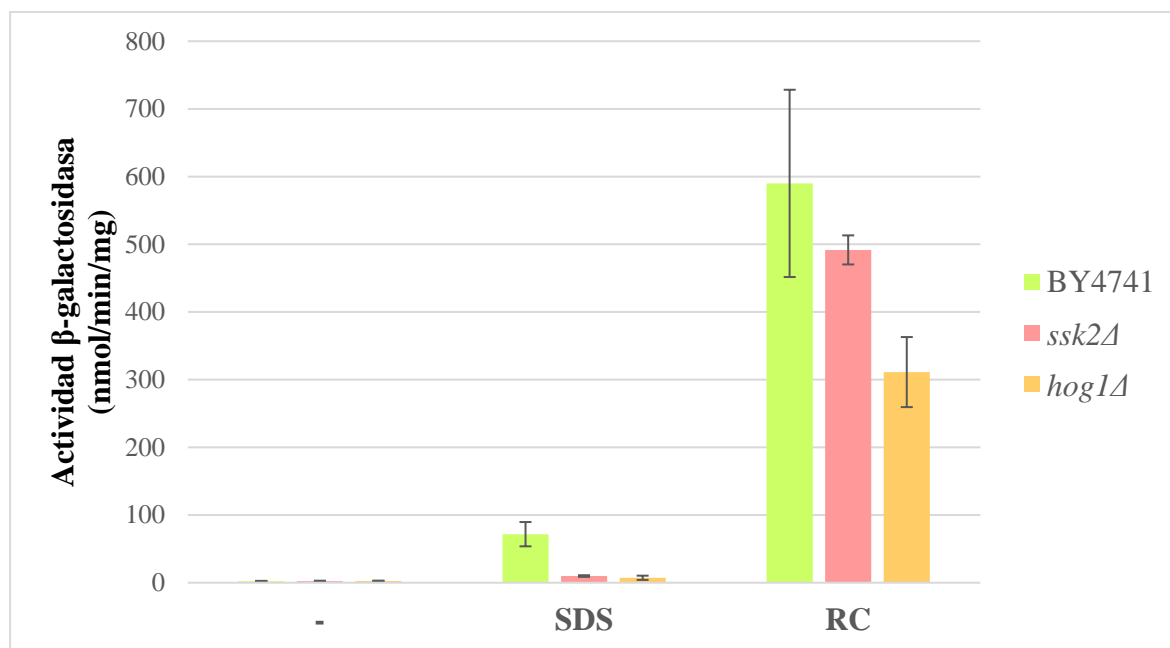


Figura 22. Análisis de la actividad β -galactosidasa en respuesta a SDS o RC de los extractos celulares de la cepa BY4741 y de los mutantes isogénicos *ssk2Δ* y *hog1Δ* transformados con el plásmido YEp352-pMLP1-lacZ. Las células se incubaron con 100 μ g/mL de SDS, 30 μ g/mL de RC o en ausencia de estímulo (-) durante 4 h en medio YPD y a 30 °C. Los datos representan la media de tres transformantes independientes, y las barras de error indican la desviación estándar.

2.4. Ssk2 no interviene en la respuesta de la ruta CWI al estrés hiperosmótico y a la latrunculina B

Está descrito que Slt2 se fosforila y activa como consecuencia de la puesta en marcha de la ruta de integridad en respuesta al choque hiperosmótico causado por sorbitol 1 M, y que este proceso al mismo tiempo es dependiente de la activación y funcionalidad de la vía de señalización de alta osmolaridad (García-Rodríguez *et al.*, 2005). Para comprobar si Ssk2 interviene también en la señalización hacia Slt2 en un medio hiperosmótico, al igual que pasa con SDS, se llevó a cabo un estudio de la fosforilación de Slt2 mediante *Western-blotting* de las células de la cepa silvestre y del mutante *ssk2Δ* expuestas a una concentración elevada de sorbitol. En la imagen de la Figura 23, se aprecia que la cinética y el nivel de fosforilación de Slt2 generados por el choque hiperosmótico en la cepa silvestre no varía cuando se elimina a Ssk2, por lo que se puede concluir que, a diferencia de la respuesta a SDS, esta MAPKKK no contribuye a la fosforilación de Slt2 por choque hiperosmótico.

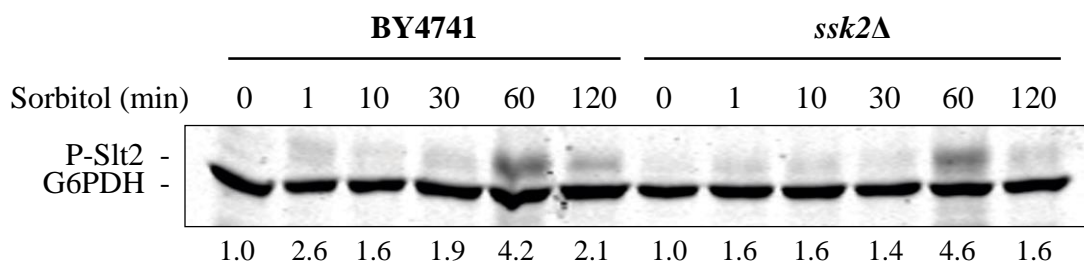


Figura 23. Determinación de la cantidad de fosfo-Slt2 en respuesta a sorbitol por *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 y del mutante isogénico *ssk2Δ*. Las células se cultivaron en YPD a 30 °C y se trataron con sorbitol 1 M durante los tiempos indicados. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. Los números de la parte inferior muestran los valores de fosforilación de Slt2 normalizados frente al control de carga y a la fosforilación basal correspondiente a la ausencia de sorbitol (0).

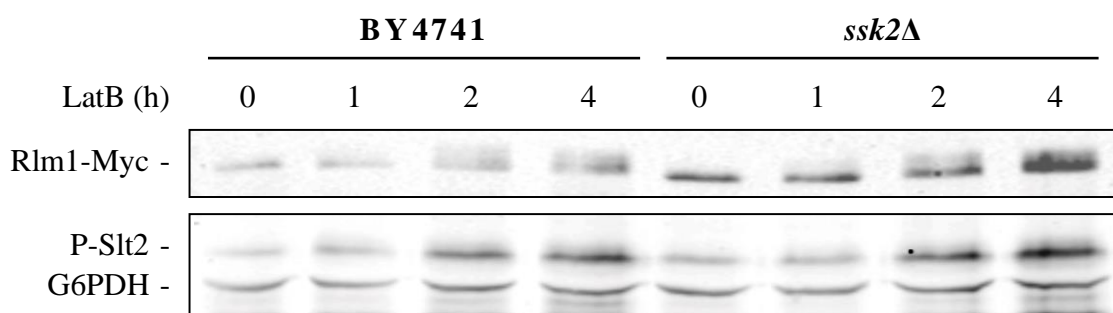


Figura 24. Estudio de la fosforilación de Slt2 inducida por el tratamiento con latrunculina B mediante *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa YEE2019 y del mutante isogénico *ssk2Δ* YEE2020, ambas cepas con la construcción *RLM1-6MYC* integrada en su genoma, incubadas a 30 °C y en YPD sin (tiempo 0) o con 39.6 μM de latrunculina B (LatB) durante los tiempos indicados. La fusión Rlm1-Myc, la fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-Myc, anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

Por otro lado, tanto la ruta CWI (Delley and Hall, 1999) como Ssk2 (Yuzyuk *et al.*, 2002) son necesarias para la repolarización del citoesqueleto de actina tras un choque térmico e hiperosmótico, respectivamente. De hecho, dado que Ssk2 interacciona con la actina, ha sido propuesta como sensor de la actina despolimerizada (Yuzyuk *et al.*, 2002). Al mismo tiempo, la latrunculina B (LatB) es un agente despolimerizador del citoesqueleto de actina que se ha visto que activa a la ruta CWI (Harrison *et al.*, 2001). En este contexto, la detección por parte de Ssk2 de la despolarización del citoesqueleto de actina inducida por estos estreses contribuiría a la activación de Slt2, como podría estar ocurriendo en el caso del SDS. Por tanto, si esto fuera así, la falta de Ssk2 reduciría la activación de Slt2 en presencia de LatB. Sin embargo, esto no parece ocurrir, ya que, como se puede ver en el *Western blot* de la

RESULTADOS

Figura 24, la latrunculina induce de manera similar tanto en la cepa silvestre como en el mutante *ssk2Δ* la fosforilación de Slt2 y la reducción de la movilidad electroforética de Rlm1-Myc, provocada por su fosforilación por parte de esta MAPK (Marín *et al.*, 2009).

2.5. El SDS no induce la activación transcripcional de la ruta HOG

La transmisión de la señal del SDS desde el eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG hasta el módulo de MAPKs de la ruta CWI podía darse por distintos mecanismos. Una posibilidad era que Hog1 fosforilada y activa pasara al interior nuclear para regular la expresión de una quinasa u otro elemento que mediara la activación del módulo de MAPKs de la ruta de integridad. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la activación transcripcional de la ruta HOG en respuesta a SDS mediante la cuantificación de la expresión del reportero p*STL1*-YFP, que se basa en la transcripción de la proteína fluorescente YFP controlada por el promotor de *STL1*, uno de los genes que más se induce en condiciones de osmoestrés de manera dependiente Hog1 y del factor de transcripción Hot1 (Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000).

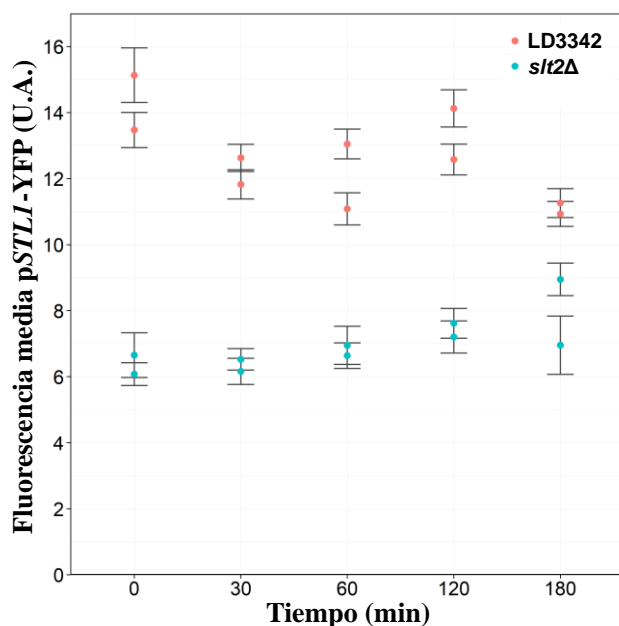


Figura 25. Análisis de la activación transcripcional de la ruta HOG en respuesta a SDS a lo largo del tiempo en la cepa silvestre LD3342 y el mutante isogénico *slt2Δ* RB3376, que presentan el reportero transcripcional p*STL1*-YFP integrado en su genoma. Las células se incubaron en medio SD completo a 30 °C en ausencia (tiempo 0) o presencia de 100 µg/mL de SDS, y se tomaron imágenes a los tiempos indicados con un microscopio de fluorescencia. La gráfica representa la fluorescencia de YFP media acumulada en cada célula de la población frente al tiempo de exposición a SDS, y cada punto se corresponde con un campo microscópico distinto, habiendo dos campos por cada muestra. Las barras de error indican la desviación estándar.

Como se puede inferir de la Figura 25, el tratamiento con SDS no produjo ningún incremento sobre el nivel basal de expresión del reportero en la cepa silvestre. Además, en el mutante *slt2Δ*, que muestra un nivel basal de expresión de YFP mediada por el promotor *STL1* menor que la cepa silvestre, tampoco se produce un cambio significativo de expresión debido a la

exposición a SDS (Figura 25). Por tanto, este estímulo no parece activar la transcripción mediada por la ruta HOG, al menos la que depende de Hot1. En el patrón de expresión del reportero a lo largo del tiempo, llama la atención la tendencia decreciente de la cepa silvestre en comparación con la ascendente del mutante *slt2Δ*, probablemente debido a que en el segundo caso se está detectando una mayor autofluorescencia de las células muertas por la exposición prolongada a SDS.

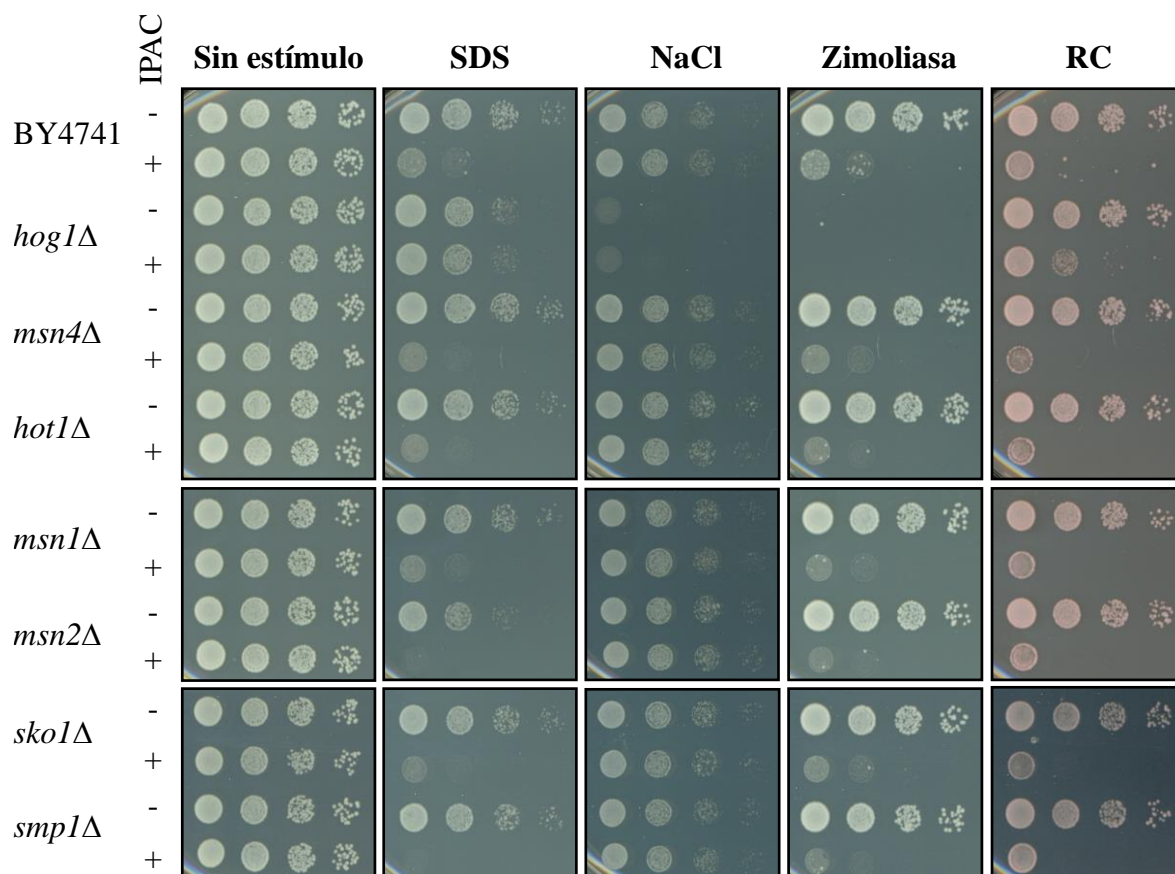


Figura 26. Ensayo de sensibilidad en placa a distintos estreses de la cepa silvestre BY4741 y de los mutantes isogénicos *hog1Δ*, *msn4Δ*, *hot1Δ*, *msn1Δ*, *msn2Δ*, *sko1Δ* y *smp1Δ* transformados con el vector vacío pHR70 (-) o con el plásmido pHR70-IPAC (+). Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de medio SD Ura- pH 6.5 sin o con 100 μ g/mL de SDS, NaCl 0.8 M, 5 U/mL de zimoliasa o 5 μ g/mL de RC, y las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Como la actividad transcripcional de la ruta HOG depende de más factores de transcripción además de Hot1, se comprobó si la falta de alguno de estos factores transcripcionales impedía la señalización del SDS por la ruta HOG hasta el circuito IPAC, permitiendo así el crecimiento celular. Como se observa en la Figura 26, ninguno de los mutantes defectivos en los factores de transcripción de esta ruta (Msn4, Hot1, Msn1, Msn2, Sko1 y Smp1) fue capaz de crecer más que la cepa silvestre en presencia del circuito activado por SDS, a

RESULTADOS

diferencia de lo que ocurre en el mutante carente de Hog1. Incluso, se observa como en los mutantes *msn2Δ* y *smp1Δ* se agrava el efecto tóxico del IPAC. La ausencia de estos factores de transcripción tampoco contrarrestó la inhibición causada por el IPAC en presencia de zimoliasa o RC, sin observarse en estas condiciones ninguna diferencia entre los mutantes (Figura 26). Estos resultados sugieren que para la estimulación de la ruta CWI por SDS no requiere la activación transcripcional mediada por Hog1.

2.6. La MAPK Hog1 no requiere su translocación al núcleo para conducir la señalización del SDS a la ruta CWI

En la misma línea, empleando un mutante *nmd5Δ*, carente de la importina implicada en la translocación nuclear de Hog1 (Ferrigno *et al.*, 1998), se confirmó que la entrada al núcleo de esta MAPK tampoco es esencial para la transmisión de la señal del SDS a la ruta de integridad celular, ya que dicho mutante se comporta igual que la cepa silvestre, no siendo capaz de contrarrestar el efecto del IPAC en combinación con SDS, como tampoco ocurre en presencia de RC (Figura 27). El hecho de que el mutante *nmd5Δ* presente crecimiento en el medio hiperosmótico (NaCl 0.8 M) es congruente con trabajos previos en los que se muestra que el importe de Hog1 al núcleo no es esencial para la supervivencia de las células en condiciones de estrés osmótico (Westfall *et al.*, 2008).

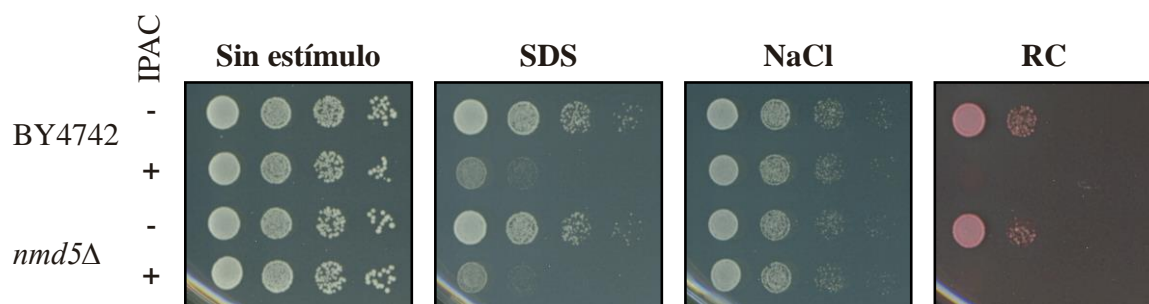


Figura 27. Ensayo de sensibilidad en placa a distintos estímulos de la cepa silvestre BY4742 y del mutante isogénico *nmd5Δ* APY276 transformados con el plásmido pHR70 vacío (-) o pHR70-IPAC (+). Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de medio SD Ura- pH 6.5 sin o con 100 μ g/mL de SDS, NaCl 0.8M o 10 μ g/mL de RC, y las placas se incubaron a 30 °C durante 48 h.

Asimismo, las células carentes de Nmd5 no presentan niveles de fosforilación de Slt2 en respuesta a SDS y a RC menores a los de la cepa silvestre (Figura 28), y la ausencia de esta importina tampoco impide la activación transcripcional dependiente de Rlm1 de la ruta CWI por SDS o RC (Figura 29).

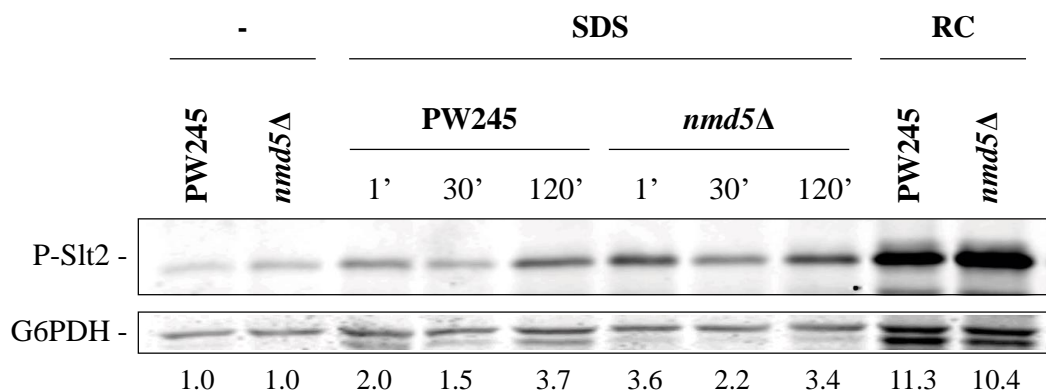


Figura 28. Observación de la fosforilación de Slt2 por *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa PW245 y del mutante isogénico *nmd5Δ* incubados a 30 °C en YPD y tratados o no (-) con 100 µg/mL de SDS durante los tiempos indicados o con 30 µg/mL de RC durante 4 h. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. Los números de la parte inferior muestran los valores de fosforilación de Slt2 normalizados frente al control de carga y a la fosforilación basal correspondiente a la ausencia de estrés de cada cepa.

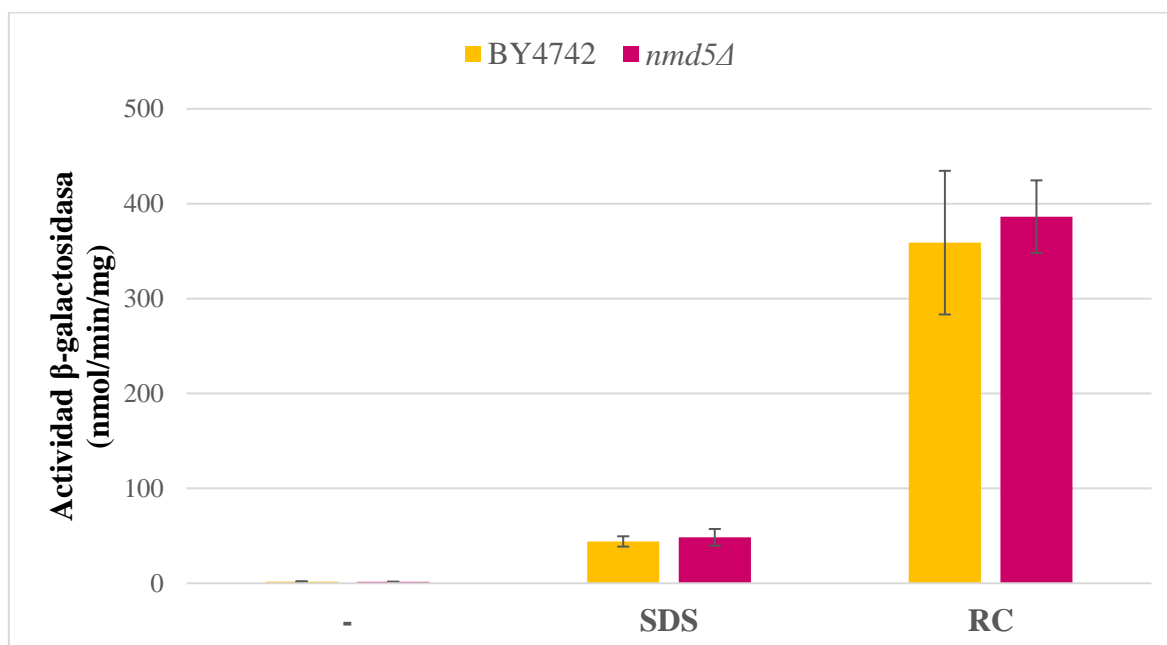


Figura 29. Determinación de la actividad β-galactosidasa en respuesta a SDS o RC de los extractos celulares de la cepa BY4742 y del mutante *nmd5Δ* APY276 transformados con el plásmido YEp352-p*MLP1-lacZ*. Las células se incubaron con 100 µg/mL de SDS, 30 µg/mL de RC o en ausencia de estímulo (-) durante 4 h en medio YPD y a 30 °C. Los datos representan la media de tres transformantes independientes, y las barras de error indican la desviación estándar.

RESULTADOS

Finalmente, el estudio mediante microscopía de fluorescencia de la localización subcelular de la fusión Hog1-Venus mostró que el tratamiento con SDS no da lugar a la translocación de Hog1 al núcleo que se observa en condiciones de estrés osmótico tras la exposición de las células a NaCl (Figura 30).

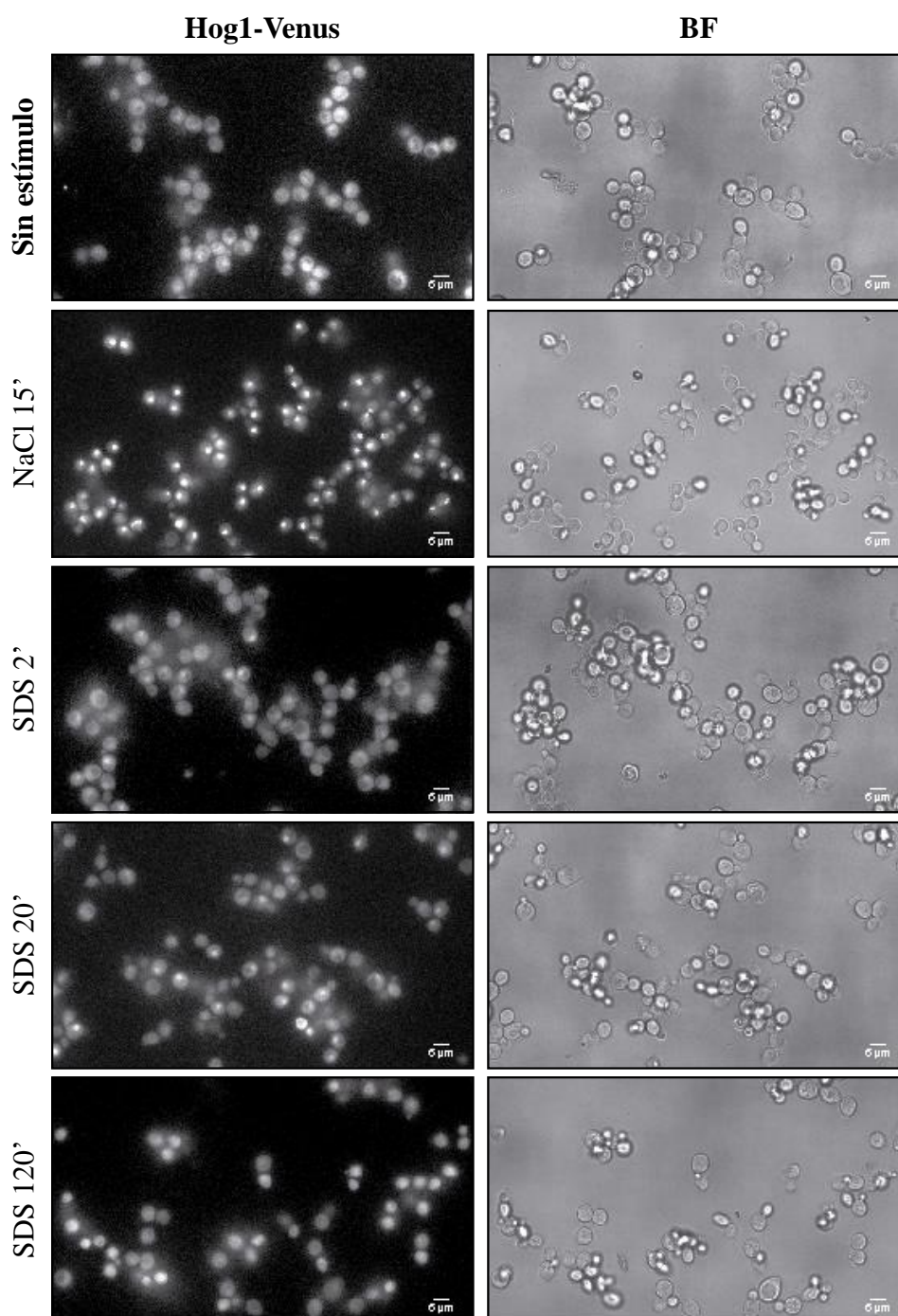


Figura 30. Microscopía de fluorescencia y de campo claro (BF, *Bright Field*) de la cepa YSP69, que expresa la proteína de fusión Hog1-Venus, incubada a 30 °C en medio SD completo en ausencia o presencia de NaCl 0.8 M o 100 µg/mL de SDS. Las imágenes se tomaron a los tiempos indicados. La barra de escala equivale a 5 µm.

2.7. El entrecruzamiento entre las rutas HOG y CWI se produce desde Hog1 a través de Bck1

Con el objetivo de ahondar más en el estudio del entrecruzamiento entre las rutas HOG y CWI, se mimetizó la activación constitutiva de la ruta de alta osmolaridad en ausencia de estímulo mediante la sobreexpresión de una versión de Ssk2 constitutivamente activa por la falta del dominio autoinhibidor de su extremo N-terminal (Met1-Cys1172), Ssk2^{ΔN}, cuya sobreexpresión es letal para las células de levadura debido a la hiperactivación permanente de la ruta HOG (Maeda *et al.*, 1995).

La sobreexpresión de Ssk2^{ΔN} en la cepa BY4741 se traduce en una hiperfosforilación de Slt2 en ausencia de estrés que es dependiente del módulo de MAPKs de la ruta HOG, ya que no tiene lugar en los mutantes *pbs2Δ* y *hog1Δ*, mientras que no desaparece si se eliminan las GEFs de Rho1, Rom1, Rom2 o Tus1 (Figura 31), lo que sugiere una independencia de la activación de Rho1. Por el contrario, en el mutante *bck1Δ* se bloquea la fosforilación de Slt2 inducida por Ssk2^{ΔN} (Figura 31), lo que indica que es necesaria la activación del módulo de MAPKs de la ruta CWI para conducir la señal desde Ssk2^{ΔN} hasta Slt2.

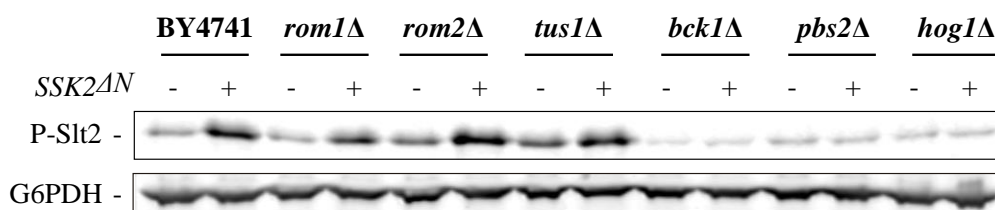


Figura 31. Análisis por *Western blotting* de la fosforilación de Slt2 de los extractos celulares de las cepas isogénicas BY4741, *rom1Δ*, *rom2Δ*, *tus1Δ*, *bck1Δ*, *pbs2Δ* y *hog1Δ* transformadas con el vector vacío pCW194 (-) o con el plásmido pRS413-pGALI-SSK2^{ΔN} (+) y cultivadas a 30 °C en medio SG His- durante 4 h. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 32A, la ausencia de Pbs2 o de Hog1 elimina la letalidad provocada por el alelo constitutivamente activo Ssk2^{ΔN} en ausencia de estrés. Lo interesante es que, además, el mutante *hog1Δ* también corta el efecto inhibitorio del IPAC inducido por la sobreexpresión de Ssk2^{ΔN} (Figura 32B). Esto indica que para el funcionamiento del circuito es imprescindible que el eje Ssk2-Pbs2-Hog1 esté intacto, y así la señalización no se vea interrumpida. Sin embargo, si el circuito IPAC es activado por RC, tanto individualmente como en combinación con Ssk2^{ΔN}, el mutante *hog1Δ* es incapaz de evitar su funcionamiento (Figura 32B).

RESULTADOS

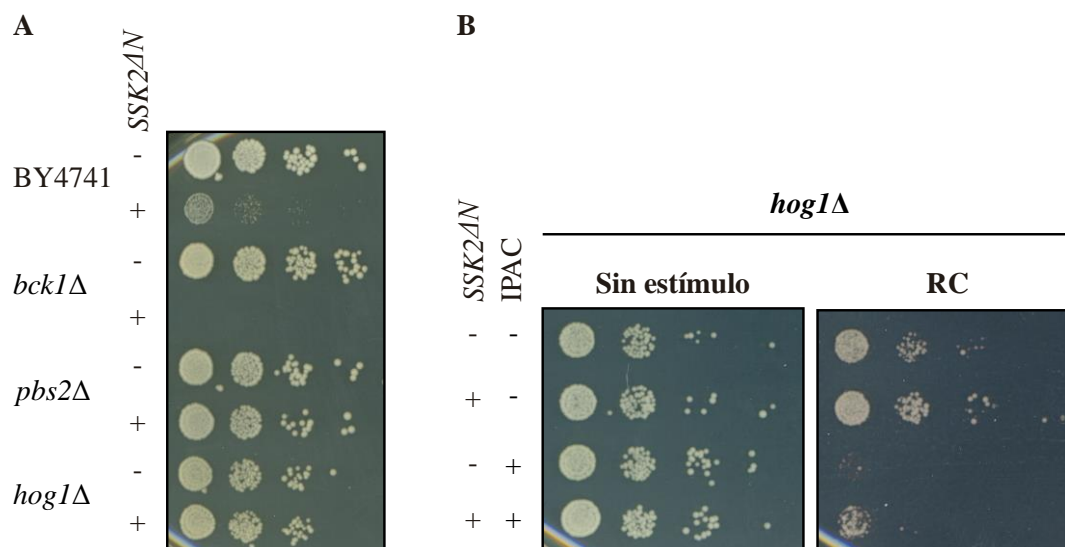


Figura 32. (A) Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa BY4741 y los mutantes isogénicos *bck1Δ*, *pbs2Δ* y *hog1Δ* transformadas con el vector vacío pCW194 (-) o con el plásmido pRS413-pGALI-SSK2^{ΔN} (+). Las diluciones decimales seriadas se sembraron en placas SG His- pH 6.5, que se incubaron a 30 °C durante 72 h. (B) Ensayo de crecimiento del mutante BY4741 *hog1Δ* en medio sólido transformado con el vector vacío pCW194 (-) o con el plásmido pRS413-pGALI-SSK2^{ΔN} (+) y con los plásmidos YCplac111 vacío (-) o YCplac111-IPAC (+). Se hicieron diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares, que se sembraron en placas SG His- Leu- pH 6.5 sin o con 5 μg/mL de RC y se incubaron a 30 °C 72 h.

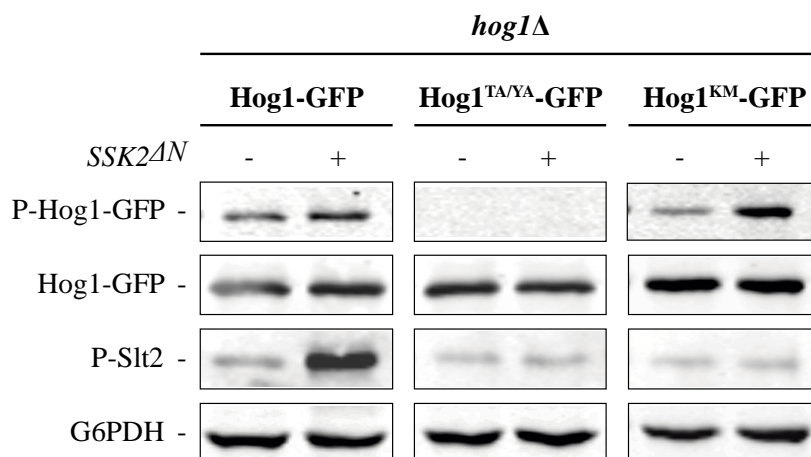


Figura 33. Estudio de la fosforilación de Slt2 mediante *Western blotting* de los extractos celulares del mutante *hog1Δ* transformado con los plásmidos pRS416-HOG1-GFP, pRS416-HOG1^{TA/YA}-GFP o pRS416-HOG1^{KM}-GFP, en combinación con el vector vacío pCW194 (-) o el plásmido pRS413-pGALI-SSK2^{ΔN} (+). Las células se cultivaron en medio SG Ura- His- a 30 °C durante 4 h. La fosforilación de Hog1, la fusión Hog1-GFP, la fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p38, anti-GFP, anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

El hecho de que el mutante no fosforilable en el dominio T-G-Y (Hog1^{T174A/Y176A}) y la versión catalíticamente inactiva (Hog1^{K52M}) de Hog1 impidan el incremento en la

fosforilación de Slt2 inducida por Ssk2^{ΔN} (Figura 33), indica que se requiere tanto la fosforilación como la actividad catalítica de Hog1 para su señalización hacia Slt2 en estas condiciones.

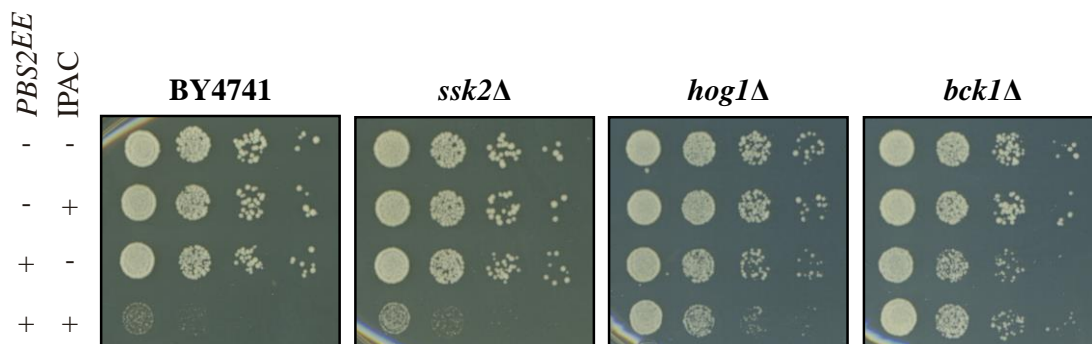


Figura 34. Ensayo de crecimiento en medio sólido de la cepa BY4741 y los mutantes isogénicos *ssb2Δ*, *bck1Δ* y *hog1Δ* transformados con el vector vacío pEG(KG) (-) o con el plásmido pEG(KG)-PBS2^{EE} (+) y con los plásmidos YCplac111 vacío (-) o YCplac111-IPAC (+). Se sembraron las diluciones decimales seriadas en placas de medio SG Ura- Leu- pH 6.5 y se dejaron crecer durante 72 h a 30 °C.

A diferencia de Ssk2^{ΔN}, la sobreexpresión de una versión fosfomimética y, por tanto, constitutivamente activa de Pbs2, Pbs2^{S514E,T518E} o Pbs2^{EE}, no genera letalidad en ausencia de estrés (Figura 34), lo que sugiere que la activación que provoca sobre la ruta HOG es de menor intensidad que la que origina la versión hiperactiva de Ssk2. Sin embargo, cuando Pbs2^{EE} se combina con el IPAC es capaz de activarlo, produciendo una intensa inhibición del crecimiento. Este entrecruzamiento de la ruta HOG con la ruta CWI desde Pbs2^{EE} depende también de Bck1 y de Hog1, ya que la ausencia de estas dos proteínas elimina dicho efecto inhibitorio (Figura 34), pero no de Ssk2, que actúa por encima de Pbs2. Estos resultados confirman la participación de esta MAPKK en el eje Ssk2-Pbs2-Hog1 que señala a la ruta CWI a través de Bck1.

2.8. Las proteínas de los módulos de MAPKs de las rutas HOG y CWI se asocian entre sí formando un complejo

Hasta el momento, todos los experimentos apuntaban a que la transmisión de la señal desde la ruta de alta osmolaridad hacia el eje Bck1-Mkk1/2-Slt2 ocurre fuera del núcleo, y no parecía estar mediada por la respuesta transcripcional de la ruta HOG. Una posibilidad atractiva era que el entrecruzamiento entre las dos rutas de señalización se debiera a que las proteínas de ambos módulos de MAPKs interaccionan físicamente entre sí. Para explorar esta posibilidad, se llevaron a cabo ensayos de co-purificación entre distintos elementos de ambas rutas (Figuras 35, 36 y 37).

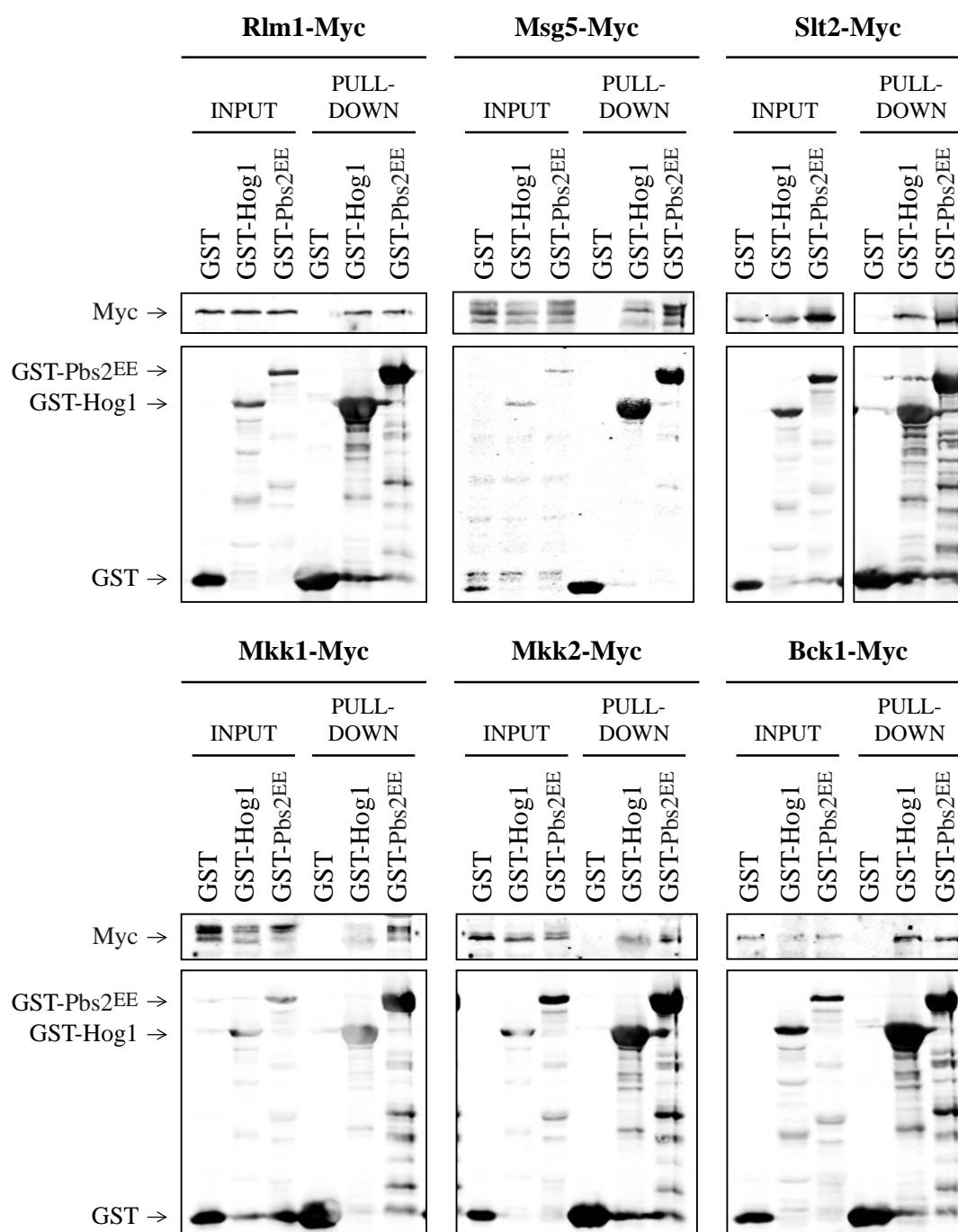


Figura 35. Ensayos de co-purificación de Rlm1-Myc, Msg5-Myc, Slr2-Myc, Mkk1-Myc, Mkk2-Myc y Bck1-Myc con las proteínas Hog1 y Pbs2^{EE} fusionadas a GST. Las cepas YMM6 (*slt2Δ RLM1-6MYC*), YMM7 (*MSG5-6MYC*), YMM3 (*SLT2-6MYC*), YMJ21 (*MKK1-6MYC*), YMJ22 (*MKK2-6MYC*) y YLP3 (*BCK1-6MYC*) fueron transformadas con los plásmidos pEG(KG) vacío, pEG(KG)-*HOG1* o pEG(KG)-*PBS2^{EE}*, y se cultivaron durante 6 h a 30 °C en medio líquido SG Ura⁻ para inducir la expresión del promotor *GAL1* de los plásmidos. Los extractos celulares (*Input*) se incubaron con una matriz de sefarosa-glutatin para purificar los complejos de GST (*Pull-down*), y se utilizaron los anticuerpos anti-Myc para detectar las proteínas etiquetadas con Myc y anti-GST para las distintas proteínas fusionadas a GST.

En una primera aproximación, en cepas que presentan diferentes proteínas de la ruta CWI marcadas con el epítipo Myc, se sobreexpresaron y posteriormente se purificaron las fusiones GST-Hog1 y GST-Pbs2^{EE} a partir de extractos celulares crudos, empleando una matriz de sefarosa-glutatin. A continuación, se detectaron con un anticuerpo anti-Myc las proteínas de la ruta CWI que permanecieron asociadas a las fusiones de GST tras los lavados de la matriz. Entre las proteínas que interaccionaron físicamente con GST-Hog1 y con GST-Pbs2^{EE}, se encuentran los cuatro componentes del módulo de MAPKs de la ruta CWI Slt2-Myc, Mkk1/2-Myc y Bck1-Myc (Figura 35). Además, tanto GST-Hog1 como GST-Pbs2^{EE} también son capaces de arrastrar a la fosfatasa Msg5-Myc y al factor de transcripción Rlm1-Myc. La interacción de Hog1 y Pbs2 con Rlm1 no puede ser indirecta a través de Slt2, porque el experimento de co-purificación se realizó con un mutante *slt2Δ* (Figura 35). A excepción de Rlm1-Myc y Bck1-Myc, cabe destacar que para el resto de las proteínas la interacción con GST-Pbs2^{EE} es más prominente que con GST-Hog1.

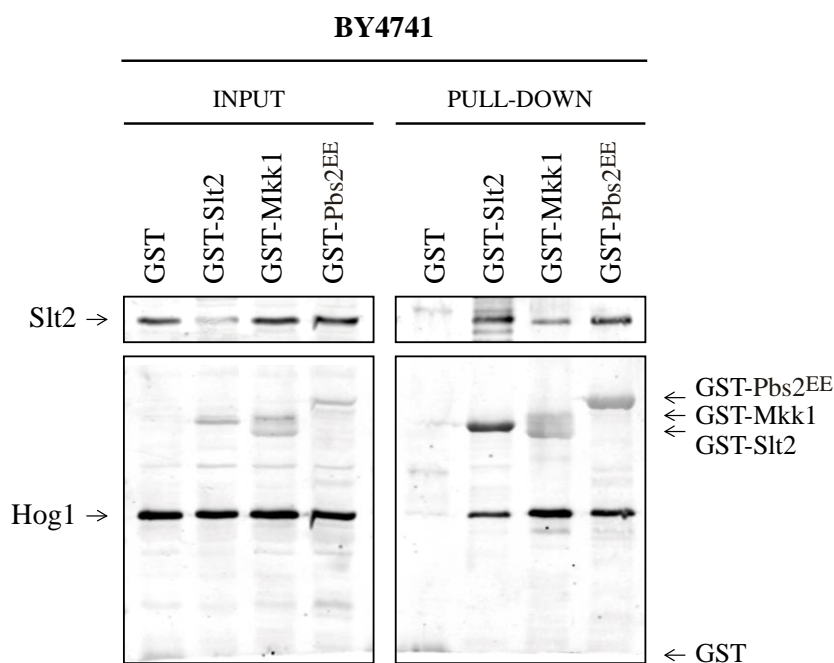


Figura 36. Ensayo de co-purificación de las proteínas Hog1 y Slt2 endógenas con las proteínas Slt2, Mkk1 y Pbs2^{EE} fusionadas a GST. La cepa BY4741 se transformó con los plásmidos pEG(KG) vacío, pEG(KG)-*SLT2*, pEG(KG)-*MKK1* o pEG(KG)-*PBS2^{EE}*, y se cultivaron durante 6 h a 30 °C en medio líquido SG Ura- para inducir la expresión de los plásmidos. Los extractos celulares (*Inputs*) se incubaron con una matriz de sefarosa-glutatin para purificar los complejos de GST (*Pull-downs*), y se utilizaron los anticuerpos anti-Hog1 y anti-Slt2 para detectar las respectivas proteínas endógenas y anti-GST para las distintas proteínas fusionadas a GST.

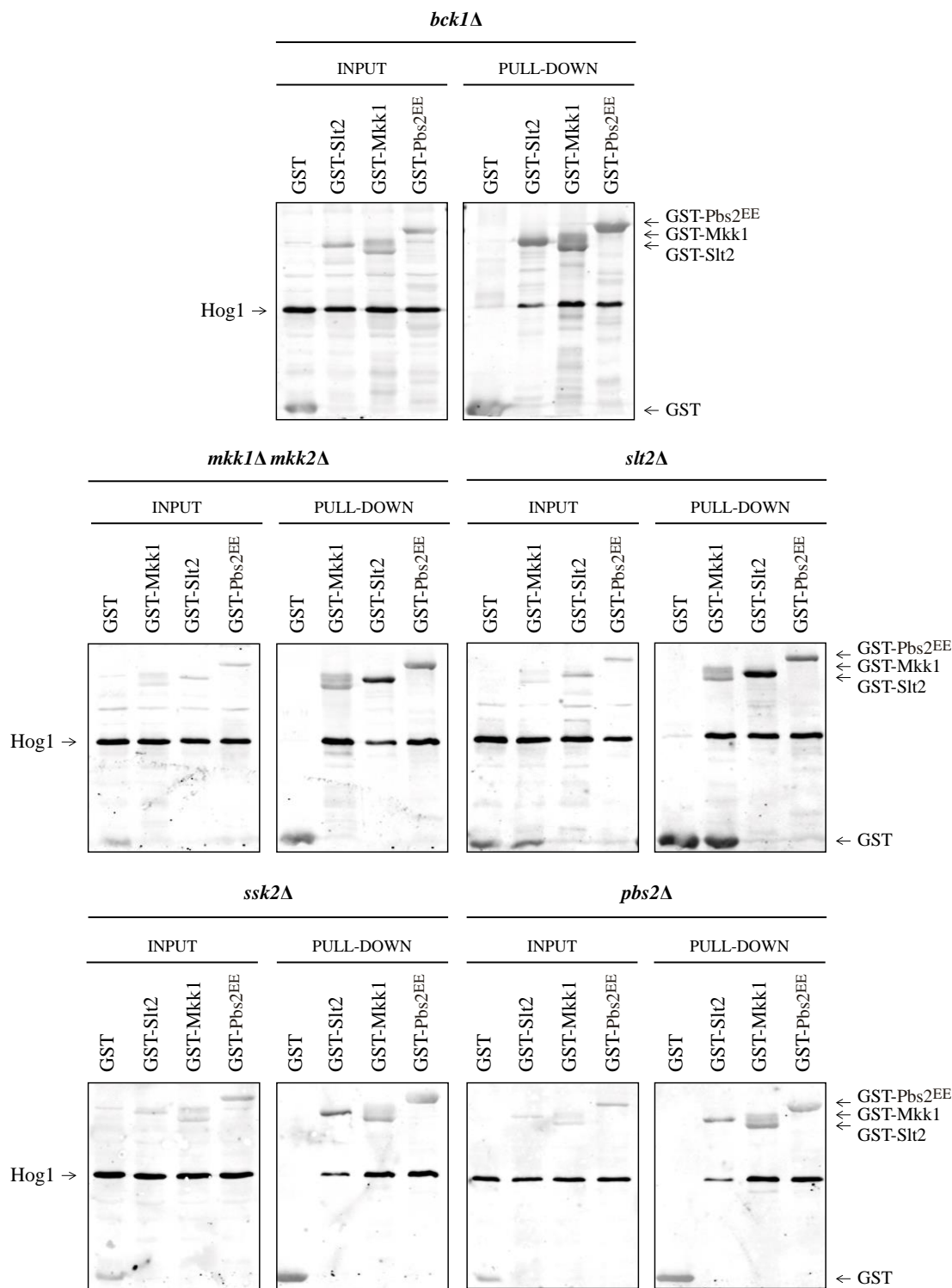


Figura 37. Ensayos de co-purificación de la proteína Hog1 endógena con las proteínas Slt2, Mkk1 y Pbs2^{EE} fusionadas a GST. Las cepas BY4741 *bck1Δ*, BY4742 *mkk1Δ mkk2Δ* (YMJ29), BY4741 *slt2Δ*, BY4741 *ssk2Δ* y BY4741 *pbs2Δ* fueron transformadas con los plásmidos pEG(KG) vacío, pEG(KG)-*SLT2*, pEG(KG)-*MKK1* o pEG(KG)-*PBS2^{EE}*, y se cultivaron durante 6 h a 30 °C en medio líquido SG Ura- para inducir la expresión del promotor *GALI* de los plásmidos. Los extractos celulares (*Inputs*) se incubaron con una matriz de sefarosa-glutatin para purificar los complejos de GST (*Pull-downs*), y se utilizaron los anticuerpos anti-Hog1, para detectar esta proteína endógena, y anti-GST, para las distintas proteínas fusionadas a GST.

Con el objetivo de confirmar dichas interacciones, se diseñó una segunda estrategia en la cual se purificaron esta vez las fusiones GST-Slt2, GST-Mkk1 y GST-Pbs2^{EE}, y se determinó su capacidad para arrastrar a las MAPKs Hog1 y Slt2 endógenas (Figura 36). Además, para comprobar si las interacciones eran dependientes de alguno de los elementos implicados en las mismas, se realizó este mismo ensayo en cepas defectivas en los componentes de los módulos de MAPKs de ambas rutas (Figura 37). Como se puede observar en las Figuras 36 y 37, además de las interacciones canónicas de Pbs2 con Hog1, de Mkk1 con Slt2, y de Slt2 consigo misma (Kim *et al.*, 2007), se repitieron en todos los casos ensayados las asociaciones entre Slt2 y Mkk1 con Hog1, independientemente de la falta de Bck1, Mkk1/2, Slt2, Ssk2 o Pbs2 (Figura 37), así como la interacción entre GST-Pbs2^{EE} y Slt2 (Figura 36). En estos ensayos de co-purificación parece que la interacción de Hog1 con Mkk1 es algo más fuerte que con Slt2.

En definitiva, las diferentes combinaciones en los experimentos de co-purificación indican que, en las condiciones ensayadas, existe una interacción física entre los componentes del módulo de MAPKs de la ruta de integridad y Pbs2-Hog1, por lo que todas estas proteínas podrían estar formando un macrocomplejo proteico cuyo ensamblaje no parece depender exclusivamente de ninguno de los integrantes, porque la delección individual de los mismos no afecta a la interacción del resto de constituyentes del posible complejo (Figura 37).

3. Estudio de la respuesta celular frente al aminoglucósido neomicina y la función de la ruta CWI en la misma

3.1. La neomicina induce inhibición del crecimiento por la activación del circuito IPAC

Los aminoglucósidos constituyen una amplia familia de antibióticos cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis proteica al actuar sobre la subunidad menor del ribosoma. La neomicina o la gentamicina, entre otros, son eficaces frente a bacterias y tienen un uso terapéutico. Sin embargo, algunos como la geneticina (G418) y la higromicina B son también activos frente a células eucarióticas, por lo que no pueden ser utilizados en clínica debido a su toxicidad, pero son útiles en el laboratorio como sistema de selección en procesos de transformación en hongos o de transfección en células de mamífero (Colbère-Garapin *et al.*, 1981; Davies and Jimenez, 1980; Kaster *et al.*, 1984).

RESULTADOS

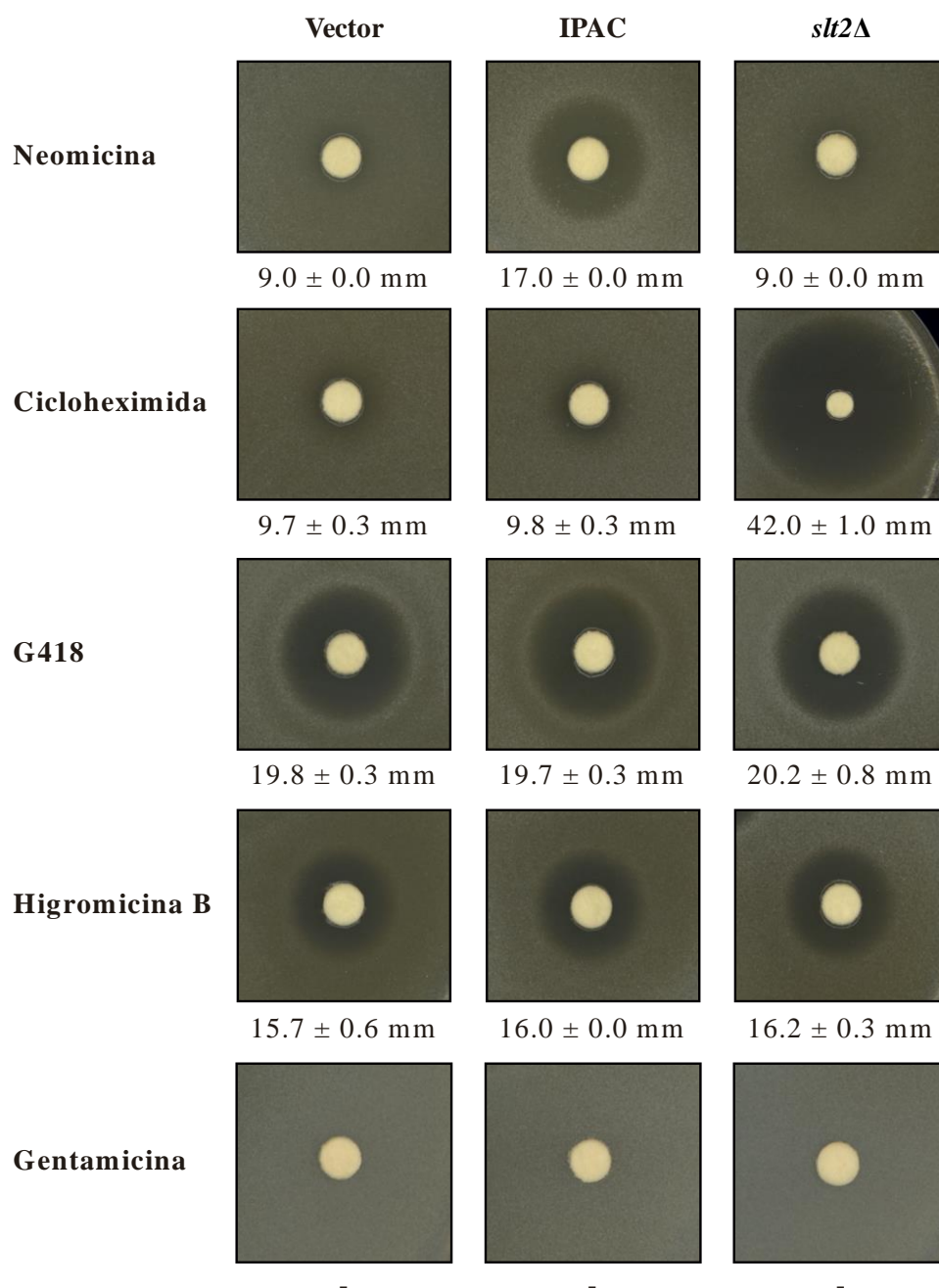


Figura 38. Ensayo de halo de inhibición del crecimiento de las cepas YSTH1 (Vector), YSTH2 (IPAC) y el mutante isogénico *slt2Δ* YSTH3 en presencia de distintos inhibidores de la síntesis proteica. Se impregnaron discos de 6 mm con 20 μ L de 100 mg/mL de sulfato de neomicina, 1 mg/mL de cicloheximida, 50 mg/mL de G418, 50 mg/mL de higromicina B o 50 mg/mL de sulfato de gentamicina, que se depositaron en placas de YPD y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Los números hacen referencia a la media del diámetro de los halos generados en tres experimentos independientes y sus correspondientes desviaciones estándar.

En un rastreo de compuestos capaces de estimular la ruta CWI con la cepa YSTH2, que presenta el IPAC integrado, realizado por nuestro grupo de investigación, se identificó a la neomicina como un antibiótico que promovía la activación del IPAC y la consecuente

inhibición del crecimiento celular (Alonso-Rodríguez, 2016). Sin embargo, se desconocía si este efecto era específico de este fármaco en concreto o propio de los aminoglucósidos o de los inhibidores de la síntesis proteica. Por tanto, se analizó el efecto de distintos compuestos de este tipo sobre la activación del circuito IPAC mediante un ensayo de crecimiento de la cepa Y3656 tanto con el vector vacío como con el IPAC integrados en su genoma. Además, en el ensayo también se incluyó a la cicloheximida, como un inhibidor de la síntesis de proteínas muy utilizado en estudios con levaduras (Schneider-Poetsch *et al.*, 2010), así como al mutante isogénico *slt2Δ*, para comparar el efecto de la hiperactivación de la ruta por el IPAC con la falta de señalización por la misma en presencia de este tipo de estímulo.

De todos los compuestos ensayados, la neomicina es el único que genera un halo de inhibición del crecimiento de mayor diámetro en las células portadoras del circuito IPAC que en las células sin IPAC, que apenas muestran sensibilidad a este aminoglucósido. Asimismo, el mutante *slt2Δ* tampoco presenta una sensibilidad significativa a este compuesto (Figura 38). La gentamicina no inhibe el crecimiento de ninguna de las tres cepas, mientras que los aminoglucósidos inhibidores de la síntesis proteica en eucariotas, higromicina B y G418, provocan la aparición de halos de inhibición de diámetro considerable y bastante similares en todos los casos. No obstante, la sensibilidad a cicloheximida es moderada y similar en las células con o sin IPAC, pero sorprendentemente elevada en el mutante *slt2Δ* (Figura 38).

3.2. La neomicina provoca un incremento de fosforilación de Slt2 en células con y sin IPAC

Al analizar la fosforilación de Slt2 mediante *Western blotting*, se observa que únicamente la neomicina provoca un mayor nivel de fosfo-Slt2, tanto en las cepas con IPAC como en las que no lo tienen (Figura 39). La cicloheximida da lugar a un incremento de fosforilación únicamente en las células portadoras del circuito, mientras que, en el caso de la gentamicina, G418 e higromicina B, no se produce ningún aumento, sino una cierta reducción de la fosforilación de Slt2. Para descartar que la menor fosforilación de Slt2 observada en presencia de estos últimos compuestos fuera consecuencia de una inhibición de la síntesis proteica, se analizaron también los niveles de Slt2 total, pero en ninguna situación se observa un descenso importante de la cantidad de esta proteína (Figura 39).

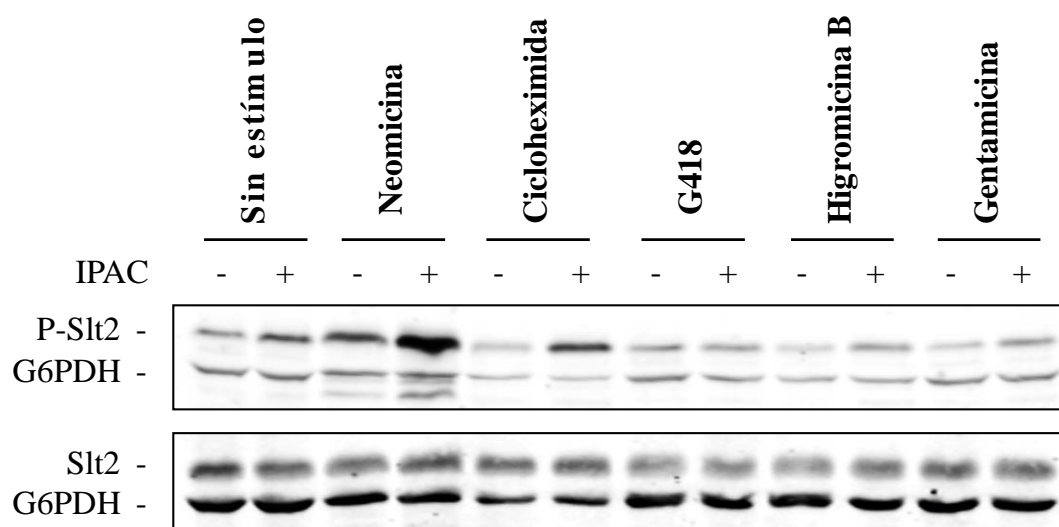


Figura 39. Análisis de la fosforilación de Slt2 mediante *Western blotting* de los extractos celulares de las cepas YSTH1 con el vector vacío (-) e YSTH2 con el IPAC integrado (+) en respuesta a la exposición a diferentes inhibidores de la síntesis proteica. Las células se incubaron a 30 °C durante 4 h en medio YPD sin o con 10 mg/mL de sulfato de neomicina, 25 µg/mL de cicloheximida, 31.3 µg/mL de G418, 62.5 µg/mL de higromicina B o 10 mg/mL de sulfato de gentamicina. La fosforilación dual de Slt2, la cantidad total de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

3.3. La cicloheximida solo activa a la versión integrada del circuito IPAC

La enorme diferencia entre el tamaño del halo de inhibición originado por la cicloheximida de las cepas Y3656 con y sin IPAC y del mutante *slt2Δ* invitó a ahondar más en el efecto que ejerce este aminoglucósido sobre las células de levadura. Por tanto, se repitió el ensayo de halo de inhibición en otra cepa diferente y con la versión plasmídica del IPAC para confirmar estos resultados. Curiosamente, como se muestra en la Figura 40, en el fondo genético BY4741, el diámetro del halo generado por la cicloheximida es también similar en el caso del vector vacío y del IPAC, pero muy superior al que se observa en el fondo Y3656, y del orden del que provoca la delección de *SLT2* en ambos fondos genéticos. Estos resultados sugieren que la elevada sensibilidad del mutante *slt2Δ* a cicloheximida en comparación con la cepa silvestre es dependiente del fondo genético.

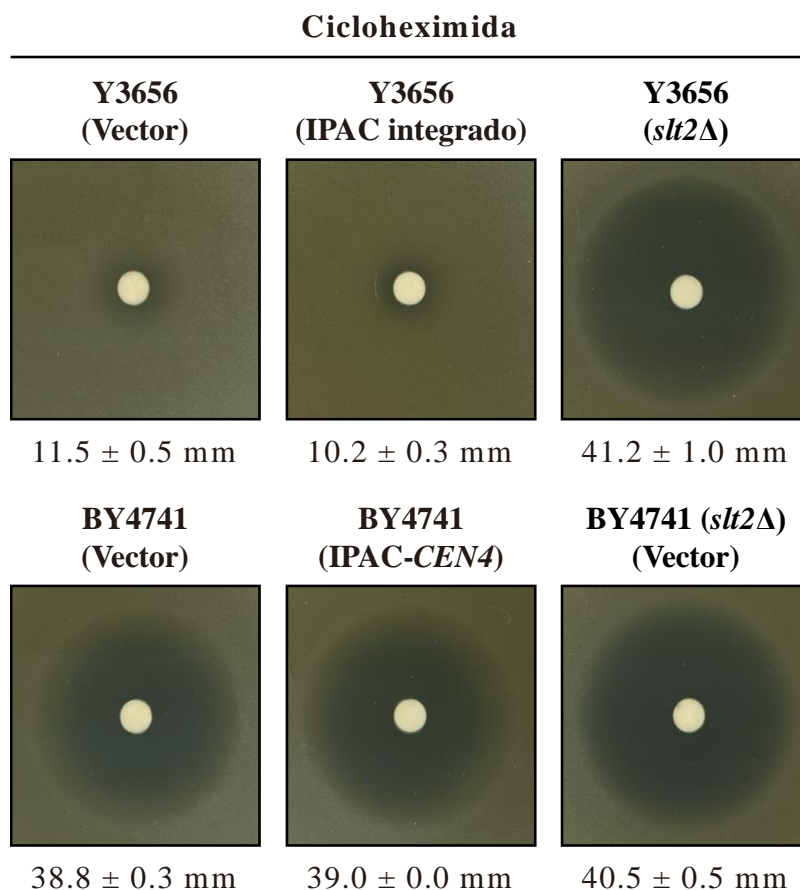


Figura 40. Ensayo de halo de inhibición del crecimiento en presencia de cicloheximida de las cepas YSTH1 (Y3656 (Vector)), YSTH2 (Y3656 (IPAC integrado)) y el mutante isogénico *slt2Δ* YSTH3, y la cepa BY4741 y el mutante isogénico *slt2Δ* transformados con el vector vacío YCplac111 (Vector) y, en el caso de la cepa silvestre, también con el plásmido YCplac111-IPAC (IPAC-*CEN4*). Se depositaron en placas de YPD discos de 6 mm impregnados con 20 μ L de 1 mg/mL de cicloheximida, que se incubaron a 30 °C durante 48 h. Los números hacen referencia a la media del diámetro de los halos generados en tres experimentos independientes y sus correspondientes desviaciones estándar.

Dado que la presencia del IPAC con cicloheximida no se traduce en un incremento de la inhibición del crecimiento, se analizó la fosforilación de Slt2 y la cantidad de Rlm1-Myc en respuesta a cicloheximida en estos dos fondos genéticos y con ambas versiones del circuito, integrado y en plásmido. Tal y como se observa en la Figura 41, y coincidiendo con los resultados previos (Figura 39), este compuesto aumenta la fosforilación de Slt2 en la cepa con el circuito integrado. Sin embargo, en el resto de las cepas, la cicloheximida no solo no incrementa la fosforilación de la MAPK, sino que conduce a una reducción de la misma. Este efecto inhibitor es incluso más evidente en cuanto a la cantidad de Rlm1, ya que se reduce de manera muy significativa si se compara con el nivel en ausencia de cicloheximida, como se observa en la cepa BY4741 que tiene integrada una copia de este factor de

RESULTADOS

transcripción marcado con el epítipo Myc (Figura 41). Se observa también una ligera reducción de la G6PDH en todas las muestras con cicloheximida, pero es proporcionalmente menor a la que presenta Rlm1. Por otra parte, el circuito incrementa la cantidad de Rlm1, tanto en ausencia como en presencia de cicloheximida, donde este aumento es muy moderado.

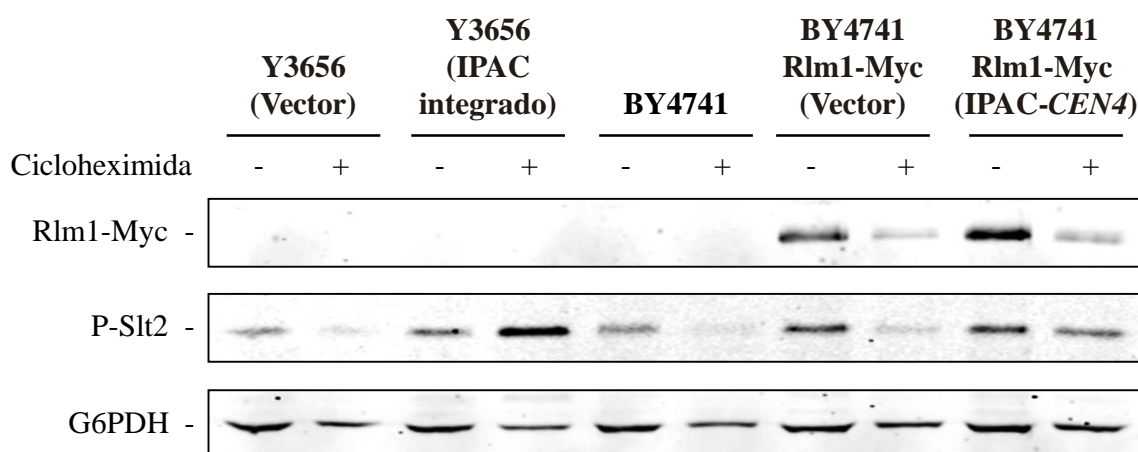


Figura 41. Determinación del nivel de fosfo-Slt2 por *Western blotting* en respuesta a cicloheximida de los extractos celulares de las cepas YSTH1 (Y3656 (Vector)), YSTH2 (Y3656 (IPAC integrado)), BY4741 e YEE2019 (*RLM1-6MYC*) transformada con el vector vacío YCplac111 (Vector) o con el plásmido YCplac111-IPAC (IPAC-*CEN4*). Las células se incubaron a 30 °C en medio YPD sin (-) o con (+) 25 µg/mL de cicloheximida durante 4 h. La fusión Rlm1-Myc, la fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-Myc, anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

En resumen, la cicloheximida parece activar a la ruta de integridad muy levemente, ya que solo se aprecia a nivel molecular con ayuda de la amplificación del circuito integrado, si bien esta activación del circuito probablemente no sea suficiente para que se refleje a nivel fenotípico como inhibición del crecimiento, lo que concuerda con la ligera activación de Rlm1 observada.

3.4. La señalización inducida por neomicina requiere la funcionalidad de varias rutas de señalización

Dado que la neomicina era el único aminoglucósido ensayado que provocaba la activación de la ruta CWI en ausencia del IPAC, se profundizó en la señalización que disparaba este compuesto. Como se ha mencionado anteriormente, un mismo estrés puede activar varias vías de señalización al mismo tiempo, por lo que se estudió la implicación de otras rutas, además de la de integridad celular, y así intentar dilucidar su mecanismo de acción.

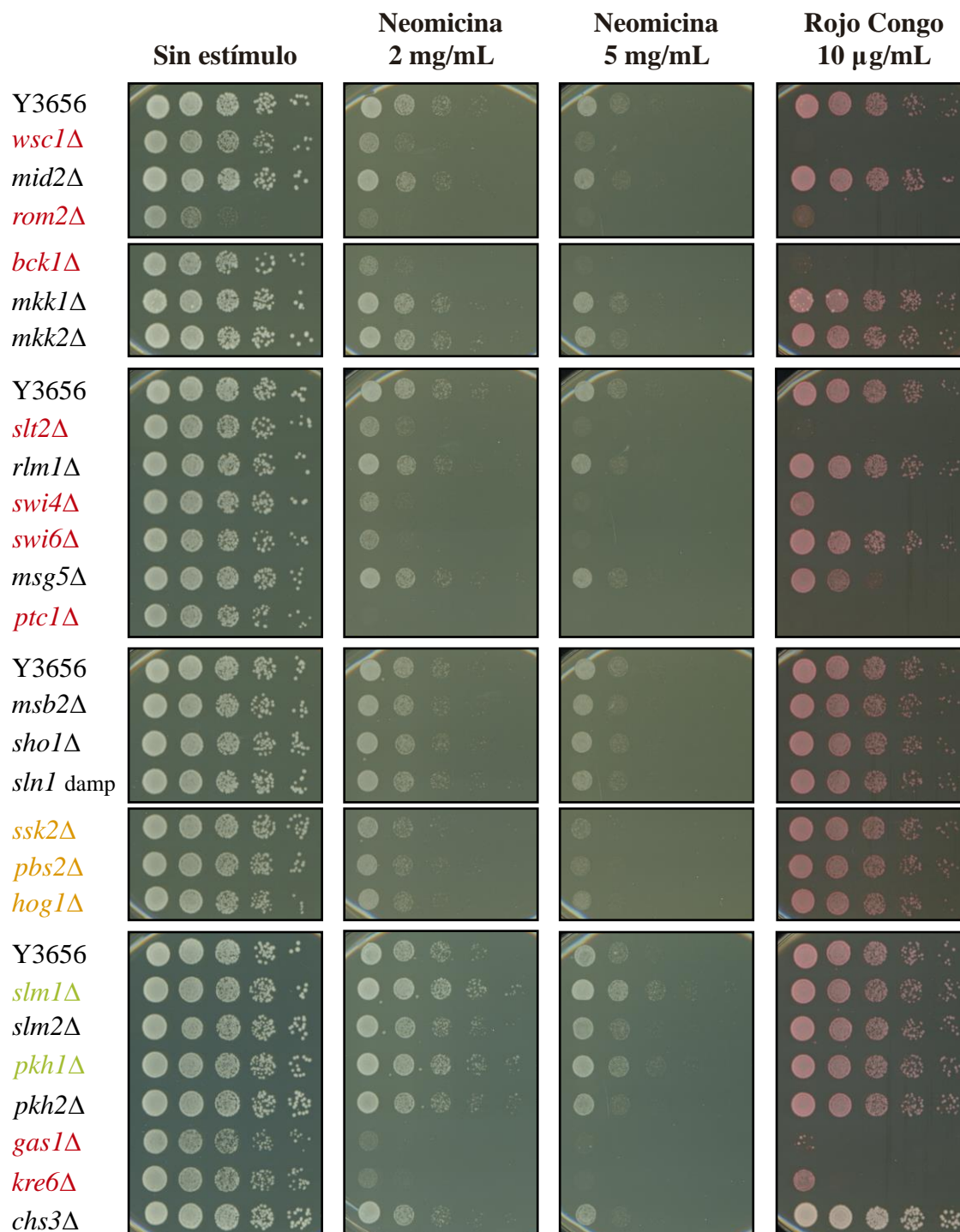


Figura 42. Ensayo de sensibilidad en placa a sulfato de neomicina o a RC de la cepa silvestre Y3656 y de los distintos mutantes isogénicos indicados, defectivos en diferentes componentes de las rutas de señalización CWI y HOG, en las proteínas Pkh1/2 y Slm1/2 o deficientes en la biogénesis de la pared. Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de YPD sin o con 2 o 5 mg/mL de sulfato de neomicina o 10 µg/mL de RC, y estas se incubaron a 30 °C durante 48 h. La gradación de colores indica el grado de sensibilidad a neomicina, siendo el rojo la máxima sensibilidad, el naranja una sensibilidad intermedia y el verde una resistencia a neomicina mayor que la cepa silvestre. En negro se muestran los mutantes cuya sensibilidad es muy similar a la de la cepa silvestre.

En primer lugar, se llevó a cabo un ensayo de sensibilidad a neomicina con distintos mutantes defectivos en componentes de las rutas CWI y HOG, en las proteínas quinasas Pkh1/2 y en las proteínas de unión a PIP₂ Slm1/2, así como con mutantes afectados en la biogénesis de la pared (Figura 42). Para este ensayo, no se pudo emplear la colección de mutantes en genes no esenciales de la colección *Euroscarf* porque las interrupciones génicas están hechas mediante la inserción del gen de resistencia a kanamicina, que presenta resistencia cruzada a la neomicina. En su lugar, se utilizaron mutantes procedentes de una subcolección generada en el fondo Y3656 mediante el uso del gen de resistencia a nourseotricina (Martin *et al.*, 2015).

Como se observa en la Figura 42, la falta de elementos clave de la ruta CWI, como el mecanosensor Wsc1, la GEF de Rho1 Rom2, la MAPKKK Bck1, la MAPK Slt2 y los componentes del factor de transcripción SBF, Swi4 y Swi6, aumentan la sensibilidad de las células al aminoglucósido a las dos concentraciones ensayadas, 2 y 5 mg/mL. De este experimento se deduce que la ruta CWI juega un papel importante en la supervivencia de la levadura en presencia de neomicina. El patrón de sensibilidad a este compuesto en cuanto a los componentes de esta ruta se parece bastante al del RC, con excepción del mutante *swi6Δ*, que es muy sensible a neomicina, mientras que en RC crece como la cepa silvestre. En cuanto a las fosfatasas, la eliminación de Ptc1, que regula negativamente a Mkk1/2, es muy deletérea tanto en presencia de neomicina como de RC, mientras que la falta de la DSP Msg5, que desfosforila directamente a Slt2, impacta mínimamente en el crecimiento con neomicina, y lo reduce con RC. Estos resultados son congruentes con la elevada activación de la ruta CWI que muestra el mutante *ptc1Δ* en condiciones de estimulación de la misma (Tatjer *et al.*, 2016), que es más moderada en el mutante *msg5Δ* (Flández *et al.*, 2004).

Por otro lado, de los mutantes ensayados de la ruta HOG, la falta de los osmosensores Msb2, Sho1 o Sln1 no incrementa la sensibilidad a neomicina, lo que sugiere que no son responsables del mecanismo de supervivencia en estas condiciones de estrés, como tampoco lo son en la señalización por RC (Figura 42). Por el contrario, el módulo de MAPKs Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG sí que participa, aunque su contribución es menos relevante que la de la ruta CWI para la respuesta celular frente a la neomicina, ya que su carencia determina un aumento de la sensibilidad menor que la de los componentes de la ruta CWI (Figura 42).

Los mutantes *gas1Δ* y *kre6Δ*, cuya pared celular presenta una integridad comprometida (Ram *et al.*, 1995; Roemer and Bussey, 1991), no solo son más sensibles que la cepa silvestre

al RC, sino que también lo son frente al aminoglucósido, lo que indica que este compuesto estaría provocando algún efecto negativo sobre la superficie celular. Es interesante señalar que el mutante defectivo en la quitín sintasa III no muestra una sensibilidad significativa a ninguno de los dos compuestos.

Por otra parte, *slm1Δ* y *pkh1Δ* son más resistentes a la neomicina que los mutantes en sus proteínas parálogas *slm2Δ* y *pkh2Δ*, e incluso que la cepa silvestre.

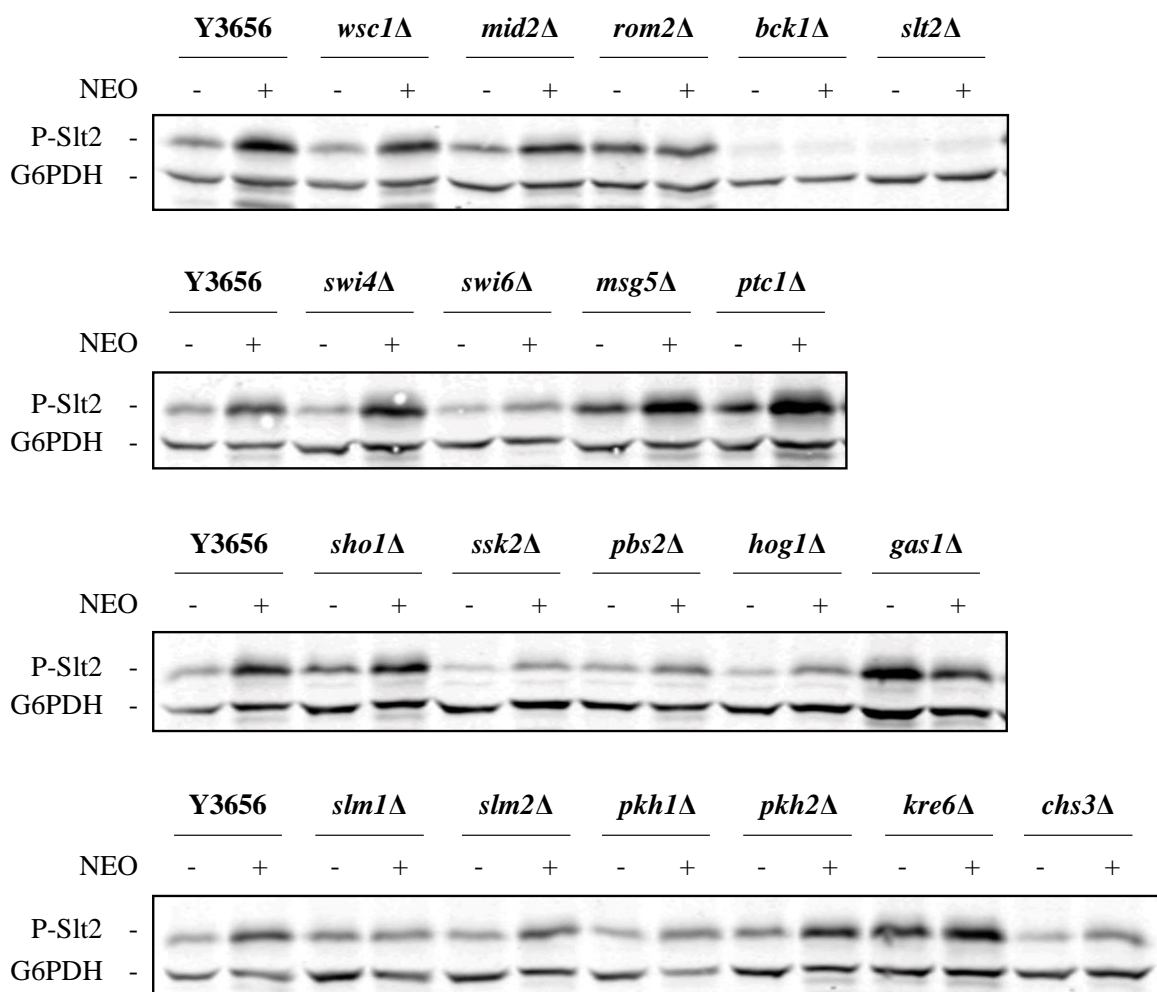


Figura 43. Análisis de la fosforilación de Slt2 en respuesta a neomicina por *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa Y3656 y de los mutantes isogénicos indicados, defectivos en diferentes componentes de las rutas de señalización CWI y HOG, en las proteínas Pkh1/2 y Slm1/2 o deficientes en la biogénesis de la pared. Las células se trataron (+) o no (-) con 10 mg/mL de sulfato de neomicina en medio YPD y a 30 °C durante 4 h. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

A continuación, se determinaron los niveles de fosforilación de Slt2 inducida por la neomicina en los mutantes que mostraron los fenotipos más interesantes en el ensayo de

crecimiento (Figura 43). La señalización del aminoglucósido por la ruta CWI se encuentra totalmente impedida en el mutante *bck1Δ* y, por supuesto, en el *slt2Δ*, lo que coincide con el nivel de hipersensibilidad mostrado por estos mutantes. También encajan el grado de sensibilidad a neomicina y la reducción de la señalización en los mutantes *rom2Δ* y *swi6Δ*, pero no en el mutante *swi4Δ*, que, a pesar de ser bastante sensible a la neomicina, no corta la fosforilación de Slt2. Los dos mutantes ensayados afectados en los sensores de la ruta Wsc1 y Mid2 presentan una ligera y muy similar reducción de la señalización inducida por neomicina, aunque en el ensayo de crecimiento el mutante *mid2Δ* no mostraba diferencias de sensibilidad con la cepa silvestre (Figura 42). Curiosamente, una reducción de la señalización ocurre también tanto en el mutante *slm1Δ* como en el *pkh1Δ*, que crecen mejor que la cepa silvestre en presencia de neomicina, mientras que las mutaciones *slm2Δ* y *pkh2Δ* no muestran ningún efecto sobre la fosforilación de Slt2 (Figura 43).

Con respecto a las proteínas fosfatasa, el mutante *ptc1Δ* muestra una hiperactivación superior a la del mutante carente de Msg5 (Figura 43), lo cual coincide con la elevada sensibilidad a neomicina que presentaba el primero (Figura 42).

En cuanto a los mutantes de la ruta HOG, se observa una interrupción parcial de la señalización por la ruta CWI en los mutantes *ssk2Δ*, *pbs2Δ* y *hog1Δ* (Figura 43), que se corresponde con la sensibilidad moderada de estos mutantes a la neomicina (Figura 42). Por otro lado, el mutante defectivo en el osmosensor Sho1 no tiene reducida la fosforilación de Slt2, por lo que esta rama de la ruta HOG no parece estar implicada en la señalización hacia la ruta de integridad. Todo ello indicaría la participación del eje Ssk2-Pbs2-Hog1 en la señalización de la neomicina hacia Slt2.

Por último, la falta de Chs3 no afecta significativamente a la fosforilación de Slt2 inducida por neomicina (Figura 43), como tampoco ocurría con la sensibilidad a este compuesto (Figura 42). En los mutantes *gas1Δ* y *kre6Δ*, se observa una fosforilación basal de Slt2 elevada por la alteración de la biogénesis de la pared de estos mutantes (Lagorce *et al.*, 2003), pero en el caso de *gas1Δ* no se incrementan los niveles de fosforilación por neomicina, y, de hecho, incluso se reducen, lo que no ocurre en el mutante *kre6Δ* (Figura 43).

3.5. El factor de transcripción Rlm1 se activa débilmente por neomicina

Al analizar la activación de Rlm1, como se muestra en la Figura 44, la neomicina promueve ligeramente la expresión de este factor de transcripción, acorde con el moderado aumento de

la fosforilación de Slt2 observado en ausencia del circuito. Estos efectos se ven potenciados en las células con el IPAC, en los que se intuye también tenuemente el cambio de movilidad electroforética característico de la fosforilación de Rlm1 por Slt2, indicativo de su activación. Si bien la activación es mucho menor que la disparada por el RC, estos resultados sugieren la participación de Rlm1 en la respuesta inducida por neomicina.

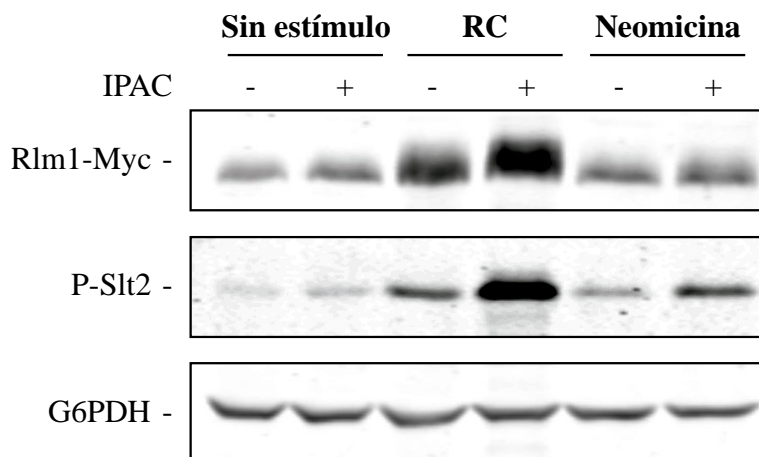


Figura 44. Estudio de la fosforilación de Slt2 mediante *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa YEE2019 (*RLM1-6MYC*) transformada con el vector vacío YCplac111 (-) o con el plásmido YCplac111-IPAC (+) e incubada a 30 °C durante 4 h en medio YPD en ausencia de estímulo o con 30 µg/mL de RC o 10 mg/mL de sulfato de neomicina. La fusión Rlm1-Myc, la fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH, como control de carga, fueron detectadas con los anticuerpos específicos anti-Myc, anti-fosfo-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

Para cuantificar el nivel de activación de Rlm1 como consecuencia del tratamiento con neomicina, se hizo un ensayo de determinación de la actividad β -galactosidasa del reportero de la ruta *pMLPI-lacZ* (Figura 45). En la gráfica se ve que, a pesar de que la expresión del reportero es residual si la comparamos con la promovida por los otros dos estímulos de la ruta CWI ensayados, el RC y la zimoliasa, esta aumenta prácticamente el doble cuando se compara con la ausencia de estímulo. Este incremento, aunque pequeño, explicaría la mayor sensibilidad de las células con IPAC en presencia de neomicina (Figura 38). Sin embargo, ninguno de los mutantes *sho1* Δ , *ssk2* Δ y *pbs2* Δ tiene un impacto significativo en la baja inducción de la actividad β -galactosidasa registrada con neomicina (Figura 45), lo cual es lógico dada la contribución parcial de estos componentes de la ruta HOG a la señalización por este estímulo. Sí que se observan diferencias en las células tratadas con zimoliasa, ya que *sho1* Δ y *pbs2* Δ impiden la actividad transcripcional de la ruta CWI, como estaba descrito (García *et al.*, 2009). Curiosamente, con RC se observa una reducción parcial de la actividad

RESULTADOS

del reportero en el mutante *pbs2* Δ (Figura 45). Aunque este mutante no muestre mayor sensibilidad a RC (Figura 42), es destacable que se aprecia cierta inhibición del crecimiento cuando contiene el IPAC (Figura 20), lo que apoya la sensibilidad potenciada del circuito a la hora de detectar la señalización a través de la ruta CWI.

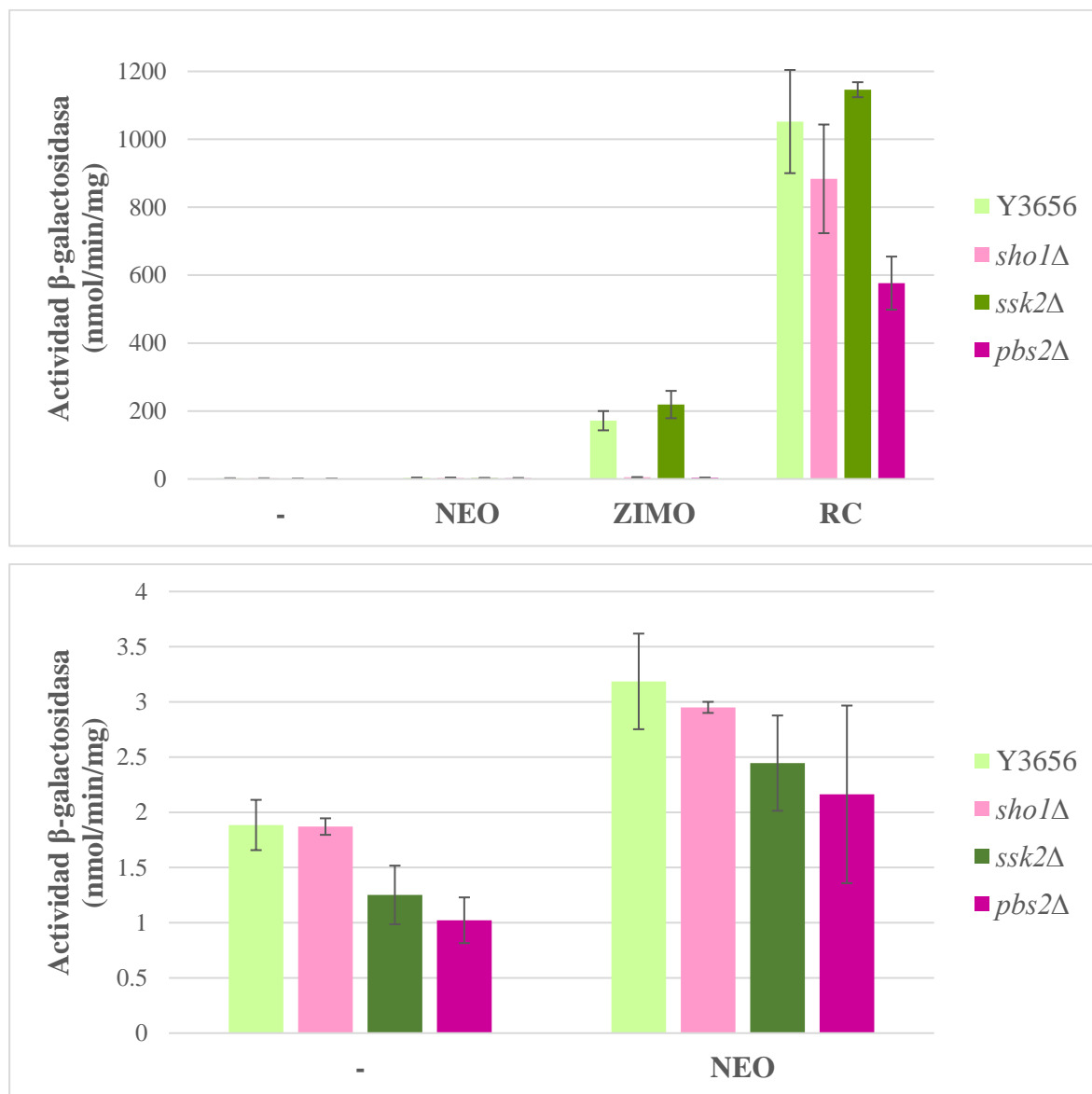


Figura 45. Cuantificación de la actividad β -galactosidasa en respuesta a neomicina, zimoliasa o RC de los extractos celulares de la cepa Y3656 y de los mutantes isogénicos *sho1* Δ , *ssk2* Δ y *pbs2* Δ transformados con el plásmido YEp352-*pMLP1-lacZ*. Las células se incubaron con 10 mg/mL de sulfato de neomicina, 0.8 U/mL de zimoliasa, 30 μ g/mL de RC o en ausencia de estímulo (-) durante 4 h en medio YPD y a 30 °C. Los datos representan la media de tres transformantes independientes, y las barras de error indican la desviación estándar. Debido a la diferencia de escala y para una mejor interpretación de los resultados, en la gráfica superior se muestran los valores obtenidos en las cuatro condiciones de incubación, mientras que la gráfica inferior solo recoge los datos sin estímulo y con neomicina.

Habida cuenta de que la neomicina podría estar afectando también a la traducción proteica y, por tanto, al ensayo de actividad β -galactosidasa en sí, también se cuantificó la expresión del gen *MLP1* dependiente de Rlm1 por RT-qPCR (Figura 46). Los valores obtenidos indican que existe una inducción significativa de este gen, sobre todo a las 4 h de tratamiento, si bien es al mismo tiempo mucho menor que en condiciones de estimulación por RC. Esto confirma la existencia de activación de Rlm1 en respuesta a neomicina y la gran utilidad del IPAC en la detección de estímulos débiles de la ruta CWI.

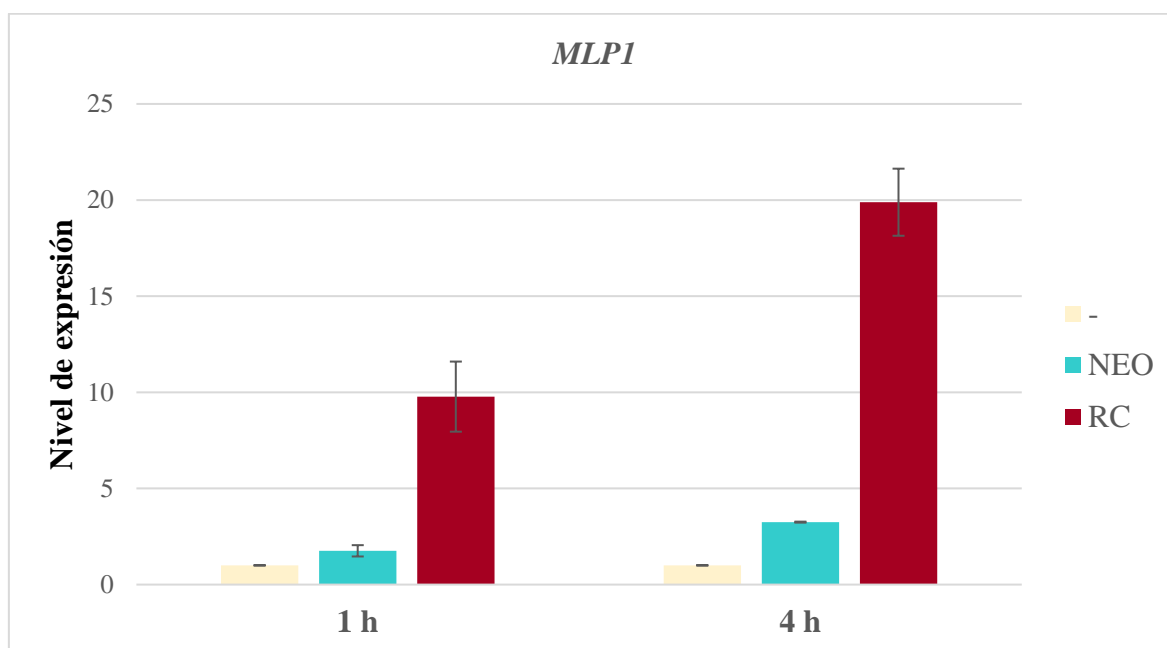


Figura 46. Estudio de la inducción transcripcional del gen *MLP1* por RT-qPCR en respuesta a neomicina en comparación con RC en la cepa Y3656. Las células se cultivaron a 24 °C en YPD en ausencia de estrés (-) o con 10 mg/mL de sulfato de neomicina o 30 μ g/mL de RC durante 1 o 4 h. La gráfica muestra la inducción media y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

4. Empleo del circuito IPAC en el rastreo de una colección comercial de moléculas en busca de nuevos activadores y reguladores negativos de la ruta CWI

La colección *Prestwick Chemical Library*® está compuesta por 1,280 moléculas de gran diversidad química y farmacológica aprobadas por la FDA para su uso como fármacos en humanos. Siguiendo la filosofía del reposicionamiento de fármacos y con el objetivo de descubrir nuevos compuestos que estimulen o interfieran con la ruta de integridad, se rastreó esta colección comercial con la cepa que presenta el circuito IPAC integrado YSTH2. En un futuro, los compuestos resultantes podrían utilizarse en terapia antifúngica, bien porque alteren directamente la pared celular del patógeno fúngico o bien porque impidan el

RESULTADOS

mecanismo compensatorio inducido por la ruta CWI. En este último caso, se podrían incluir en terapias combinadas con antifúngicos ya conocidos que actúan sobre esta estructura.

Para llevar a cabo los rastreos de la colección *Prestwick Chemical Library*® se decidió usar la versión integrada del IPAC, porque en el medio YPD induce una mayor sensibilidad al estrés de pared que el IPAC plasmídico. Además, para evitar que el propio crecimiento de la levadura provocara la acidificación del medio y esto pudiera afectar a la solubilidad de los compuestos de la colección, se tamponó el medio YPD con MES a pH 6.5 50 mM.

4.1. El circuito IPAC es activado de forma específica por seis antipsicóticos, dos antibacterianos, dos antifúngicos, un anestésico, un antiespástico y un vasodilatador

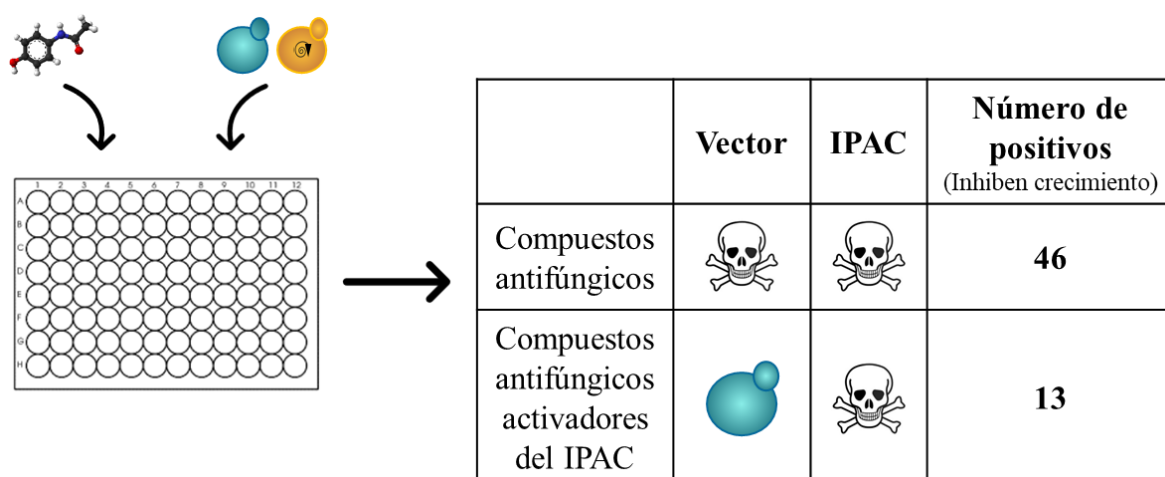


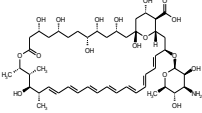
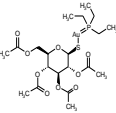
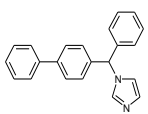
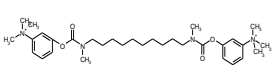
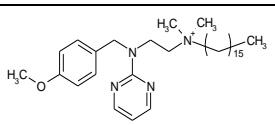
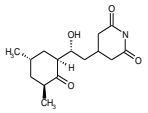
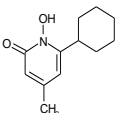
Figura 47. Esquema del rastreo de moléculas de la colección *Prestwick Chemical Library*® en busca de compuestos capaces de inhibir específicamente el crecimiento de la cepa YSTH2 con el IPAC integrado. Las células se incubaron en medio YPD-MES junto con los diferentes compuestos a 30 °C durante 24 h, y después se midió la D.O. a 600 nm de cada pocillo en un lector de placas multipocillo.

La fácil utilización del IPAC como reportero de la activación de la ruta CWI permite su empleo para la búsqueda de compuestos que la estimulen y que, por tanto, inhiban el crecimiento de la levadura. Así, en una primera aproximación, se enfrentó la colección comercial de compuestos a la cepa Y3656 con el vector vacío o con el IPAC integrados en su genoma (Figura 47). De esta manera, se podría distinguir entre los compuestos que inhiben el crecimiento de la levadura inespecíficamente, es decir, impiden la proliferación de ambas cepas, de los que lo hacen al activar la ruta y, consecuentemente, solo inhiben el crecimiento de la cepa que porta el IPAC. Tras 24 h de incubación, se consideró a los fármacos que inhibieron el crecimiento de la levadura, tanto en presencia como en ausencia

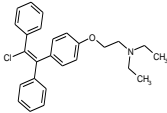
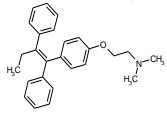
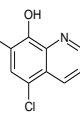
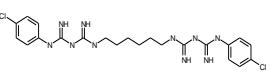
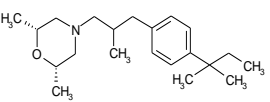
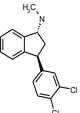
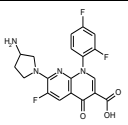
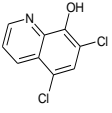
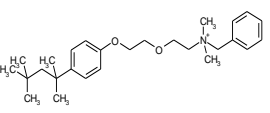
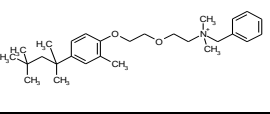
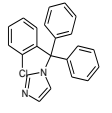
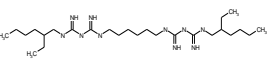
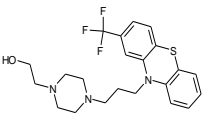
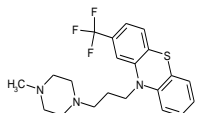
del IPAC, como mínimo un 50% respecto al control como compuestos con actividad antifúngica, y a los que inhibieron como mínimo un 50% a la cepa con el circuito y menos de un 50% a las células carentes de IPAC como moléculas activadoras de la ruta CWI y, por tanto, compuestos que posiblemente tengan como diana a la pared celular o a la membrana plasmática fúngica.

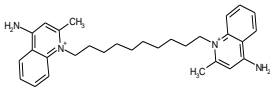
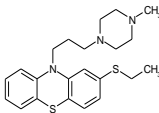
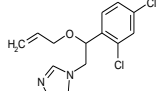
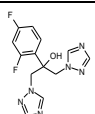
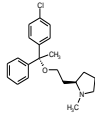
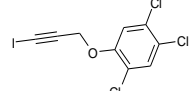
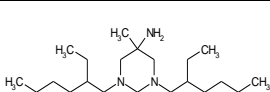
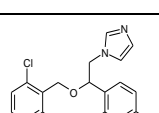
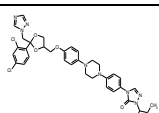
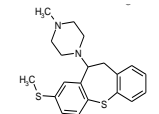
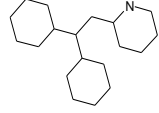
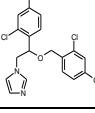
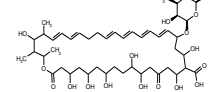
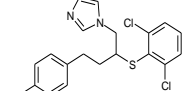
De los 1,280 compuestos, 46 impidieron el crecimiento de ambas cepas al menos en dos de las tres réplicas biológicas realizadas (Tabla 7) (ver los valores obtenidos en la Tabla I del Anexo I). Como era de esperar, la mayoría de estos compuestos son antifúngicos ya conocidos, como algunos polienos y azoles, y también algunos antibacterianos (Figura 48).

Tabla 7. Compuestos de la colección *Prestwick Chemical Library*® que, al menos en dos de los tres rastreos realizados, inhibieron ($\geq 50\%$ respecto al control) el crecimiento de la cepa Y3656 tanto con el vector vacío (YSTH1) como con el IPAC (YSTH2) integrados.

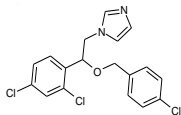
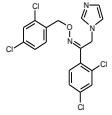
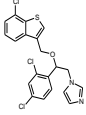
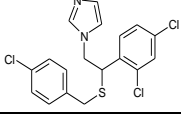
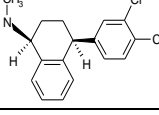
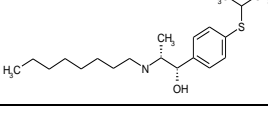
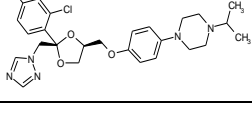
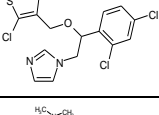
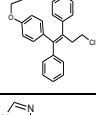
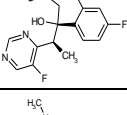
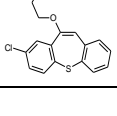
NOMBRE	ESTRUCTURA MOLECULAR	APLICACIÓN
Anfotericina B		Antibacteriano, Antifúngico
Auranofina		Analgésico
Bifonazol		Antifúngico
Bromuro de demecario		Antiglaucoma
Bromuro de tonzonio		Antiséptico
Cicloheximida		Antifúngico
Ciclopirox etanolamina		Antibacteriano, Antifúngico

RESULTADOS

Citrato de clomifeno (Z,E)		Estimulante ovulatorio
Citrato de tamoxifeno		Antineoplásico
Clioquinol		Antiamebiano, Antifúngico, Antiséptico
Clorhexidina		Antibacteriano, Antiséptico
Clorhidrato de amorolfina		Antifúngico
Clorhidrato de indatralina		Antidepresivo
Clorhidrato de tosufloxacin		Antibacteriano
Cloroxina		Antibacteriano
Cloruro de bencetonio		Antibacteriano, Antiséptico
Cloruro de metilbencetonio		Antibacteriano
Clotrimazol		Antibacteriano, Antifúngico
Diclorhidrato de alexidina		Antibacteriano
Diclorhidrato de flufenazina		Antipsicótico
Diclorhidrato de trifluoperazina		Antiemético, Antipsicótico

Dicloruro de decualinio		Antibacteriano, Antiséptico
Dimalato de tietilperazina		Antiemético, Antivertiginoso
Enilconazol		Antifúngico
Fluconazol		Antifúngico
Fumarato de clemastina		Antiemético, Antihistamínico, Sedante
Haloprogina		Antifúngico
Hexetidina		Antifúngico, Antiséptico
Isoconazol		Antibacteriano, Antifúngico
Itraconazol		Antifúngico
Maleato de metiotepina		Antipsicótico
Maleato de perhexilina		Antianginoso
Miconazol		Antifúngico
Nistatina		Antifúngico
Nitrato de butoconazol		Antibacteriano, Antifúngico

RESULTADOS

Nitrato de econazol		Antifúngico
Nitrato de oxiconazol		Antifúngico
Nitrato de sertaconazol		Antibacteriano, Antifúngico
Nitrato de sulconazol		Antifúngico
Sertralina		Antidepresivo, Estimulante del SNC
Suloctidil		Antiplaquetario, Vasodilatador
Terconazol		Antifúngico
Tioconazol		Antifúngico
Toremifeno		Antineoplásico
Voriconazol		Antifúngico
Zotepina		Antipsicótico

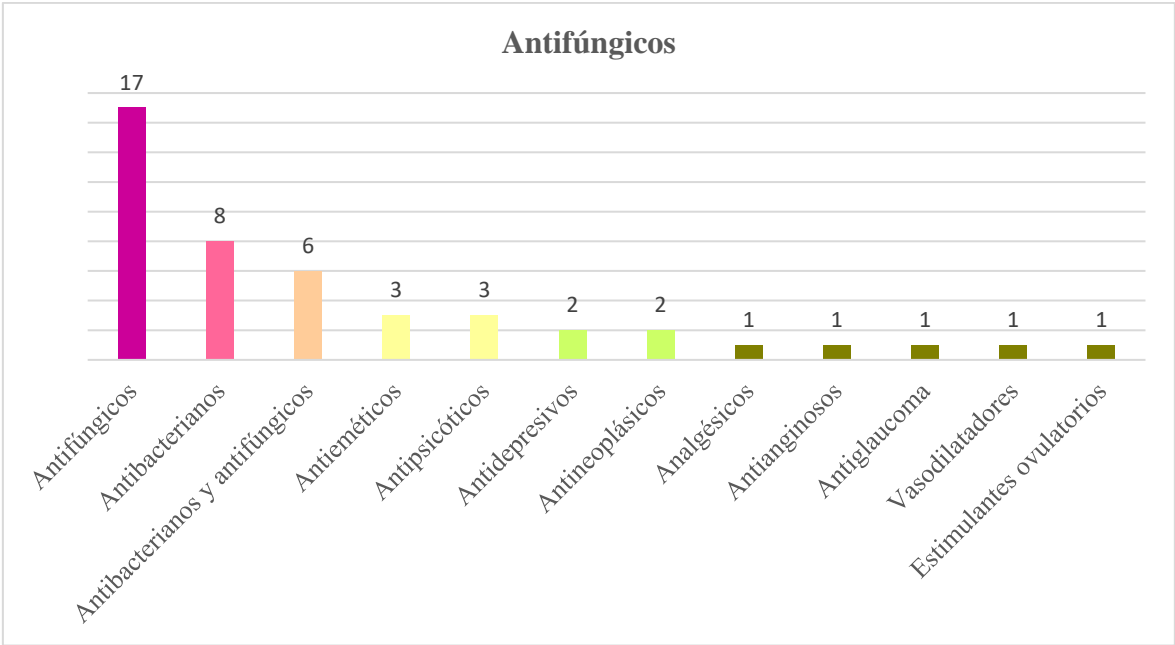


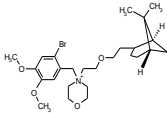
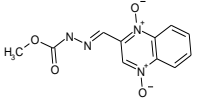
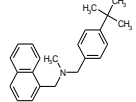
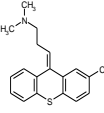
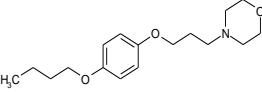
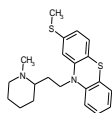
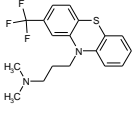
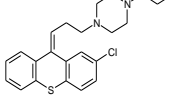
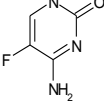
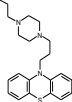
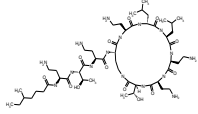
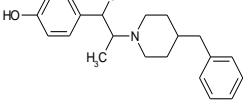
Figura 48. Gráfica de los compuestos de la colección inhibidores del crecimiento de las cepas Y3656 tanto con el vector vacío (YSTH1) como con el IPAC (YSTH2) integrados clasificados por su aplicación clínica tradicional.

Sin embargo, del total de fármacos de la colección, solo 13 moléculas fueron capaces de inhibir específicamente en mayor medida el crecimiento de la cepa con el circuito con respecto a la carente del IPAC, en al menos dos de las tres réplicas biológicas realizadas (Tabla 8) (ver los valores obtenidos en la Tabla II del Anexo I). Sorprendentemente, la mitad de estos compuestos se usan en clínica como antipsicóticos (Figura 49). También podemos encontrar antimicrobianos que actúan a nivel del DNA, como el antibacteriano carbadox y el antifúngico flucitosina (o 5-fluorocitosina), o sobre la membrana plasmática, como el antibacteriano colistina y el antifúngico butenafina.

Tabla 8. Compuestos de la colección *Prestwick Chemical Library*® que, al menos en dos de los tres rastreos realizados, inhibieron como mínimo un 50% el crecimiento de la cepa YSTH2 con el IPAC integrado y menos del 50% a la cepa YSTH1 con el vector vacío integrado.

NOMBRE	ESTRUCTURA MOLECULAR	APLICACIÓN
Bromperidol		Antipsicótico

RESULTADOS

Bromuro de pinaverio		Antiespástico
Carbadox		Antibacteriano
Clorhidrato de butenafina		Antifúngico
Clorhidrato de clorprotixeno		Antiemético, Antipsicótico
Clorhidrato de pramoxina		Anestésico local
Clorhidrato de tioridazina		Antipsicótico
Clorhidrato de triflupromazina		Antiemético, Antipsicótico, Ansiolítico
Diclorhidrato de zuclopentixol		Antipsicótico, Antiviral, Sedante
Flucitosina		Antifúngico
Perfenazina		Antiemético, Antipsicótico
Sulfato de colistina		Antibacteriano
Tartrato de ifenprodil		Vasodilatador

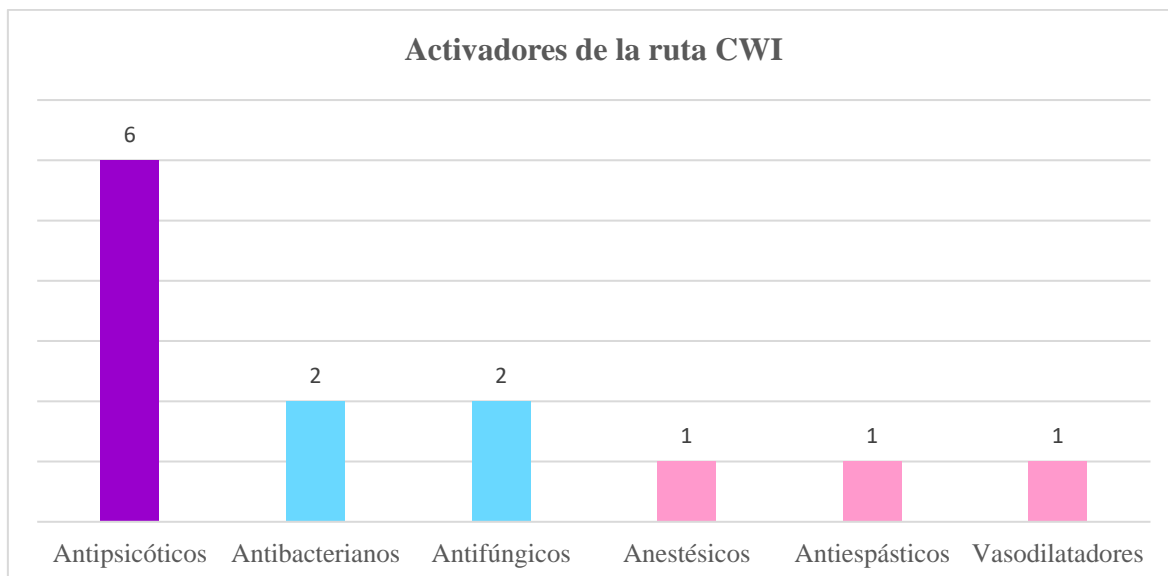


Figura 49. Gráfica de los compuestos de la colección inhibidores específicos del crecimiento de la cepa YSTH2 con el IPAC integrado clasificados por su aplicación clínica más extendida.

4.2. La activación por RC del circuito IPAC es interrumpida por 27 fármacos de la colección *Prestwick Chemical Library®*

El segundo planteamiento del rastreo de la colección consistió en poner en contacto a la cepa del IPAC activada por RC con estas moléculas. De esta forma, los pocillos correspondientes a los compuestos que interfieran en el funcionamiento del circuito serán los únicos que promuevan el crecimiento celular en estas condiciones (Figura 50).

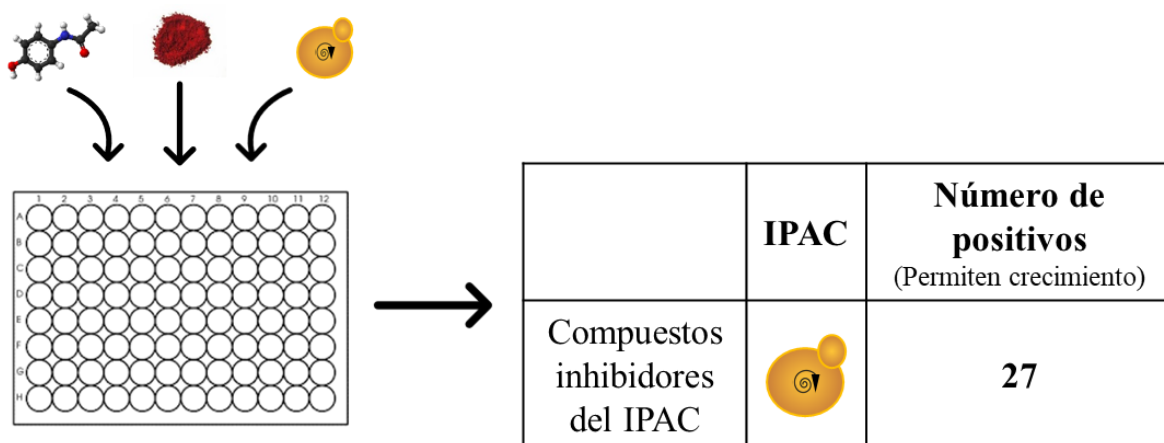
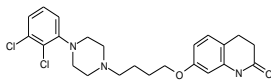
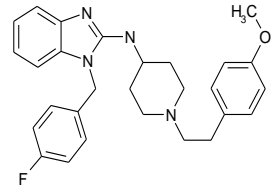
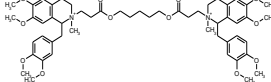
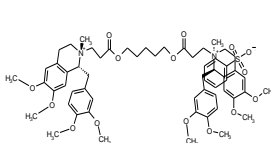
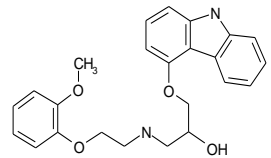


Figura 50. Representación esquemática del rastreo de moléculas de la colección *Prestwick Chemical Library®* en busca de compuestos capaces de cortar la señalización del circuito activado por RC y, por tanto, permitir el crecimiento de la cepa YSTH2 con el IPAC integrado. Las células se incubaron a 30 °C durante 24 h en medio YPD-MES junto con los diferentes compuestos y 3.13 µg/mL de RC, y después se midió la D.O. a 600 nm de cada pocillo en un lector de placas multipocillo.

RESULTADOS

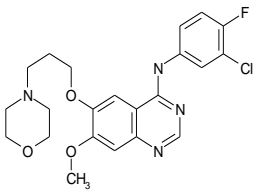
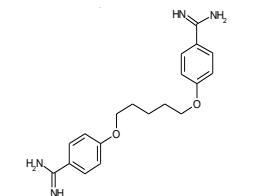
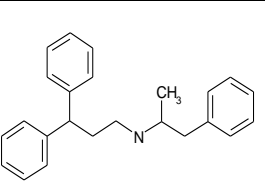
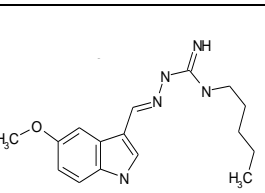
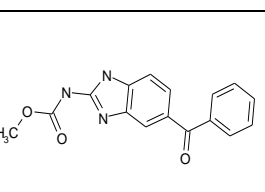
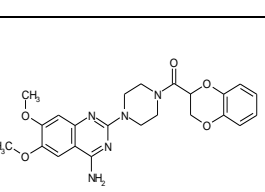
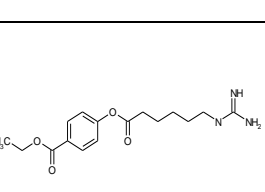
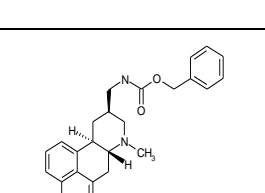
Así, se obtuvieron 27 compuestos capaces de cortar la señalización del IPAC inducida por RC, permitiendo el crecimiento de la levadura al menos en un 25% (Tabla 9) (ver los valores obtenidos en la Tabla III del Anexo I). Las aplicaciones clínicas tradicionales de estos compuestos son muy variadas, pero el grupo más amplio es el de los antiparasitarios, seguido de los antipsicóticos y de los antihipertensivos (Figura 51).

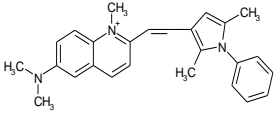
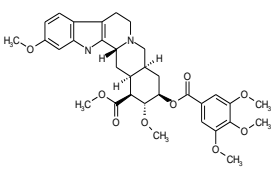
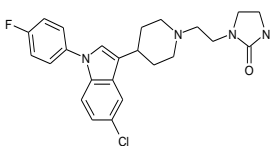
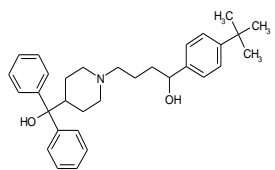
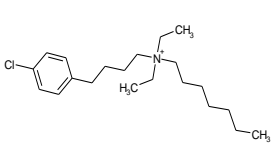
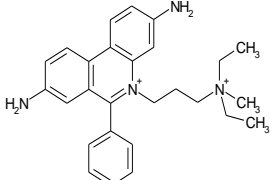
Tabla 9. Compuestos de la colección *Prestwick Chemical Library*® que, al menos en dos de los cuatro rastreos realizados, permitieron como mínimo un 25% el crecimiento de la cepa YSTH2 que presenta el IPAC integrado en presencia de RC en comparación con el control con RC y sin compuesto.

NOMBRE	ESTRUCTURA MOLECULAR	APLICACIÓN
Aripiprazol		Antipsicótico
Astemizol		Antihistamínico
Besilato de atracurio		Miorrelajante
Besilato de cisatracurio		Relajante muscular
Carvedilol		Antihipertensivo

Clorhidrato de prazosina		Antihipertensivo
Clorhidrato de raloxifeno		Modulador del receptor de estrógenos
Diclorhidrato de amodiaquina dihidratado		Antiinflamatorio, Antimalárico
Diclorhidrato de mitoxantrona		Antineoplásico
Diclorhidrato de quinacrina monohidratado		Antihelmíntico, Antileishmanial, Antimalárico, Antiparasitario, Antiprotozoario, Antitricomonal
DO 897/99		Antidepresivo
Fluspirilen		Antipsicótico
Furoato de mometasona		Antiinflamatorio

RESULTADOS

Gefitinib		Antineoplásico
Isetionato de pentamidina		Antifúngico, Antiparasitario, Antiprotozoario
Lactato de prenilamina		Antianginal, Ansiolítico, Vasodilator
Maleato de tegaserod		Gastroprocinético
Mebendazol		Antihelmíntico
Mesilato de doxazosina		Antihipertensivo
Mesilato de gabexato		Anticoagulante
Metergolina		Antiprolactina

Pamoato de pirvinio		Antihelmíntico
Reserpina		Antipsicótico
Sertindol		Antipsicótico
Terfenadina		Antihistamínico, Antipruriginoso
Tosilato de clofilio		Antiarrítmico
Yoduro de propidio		Antibacteriano

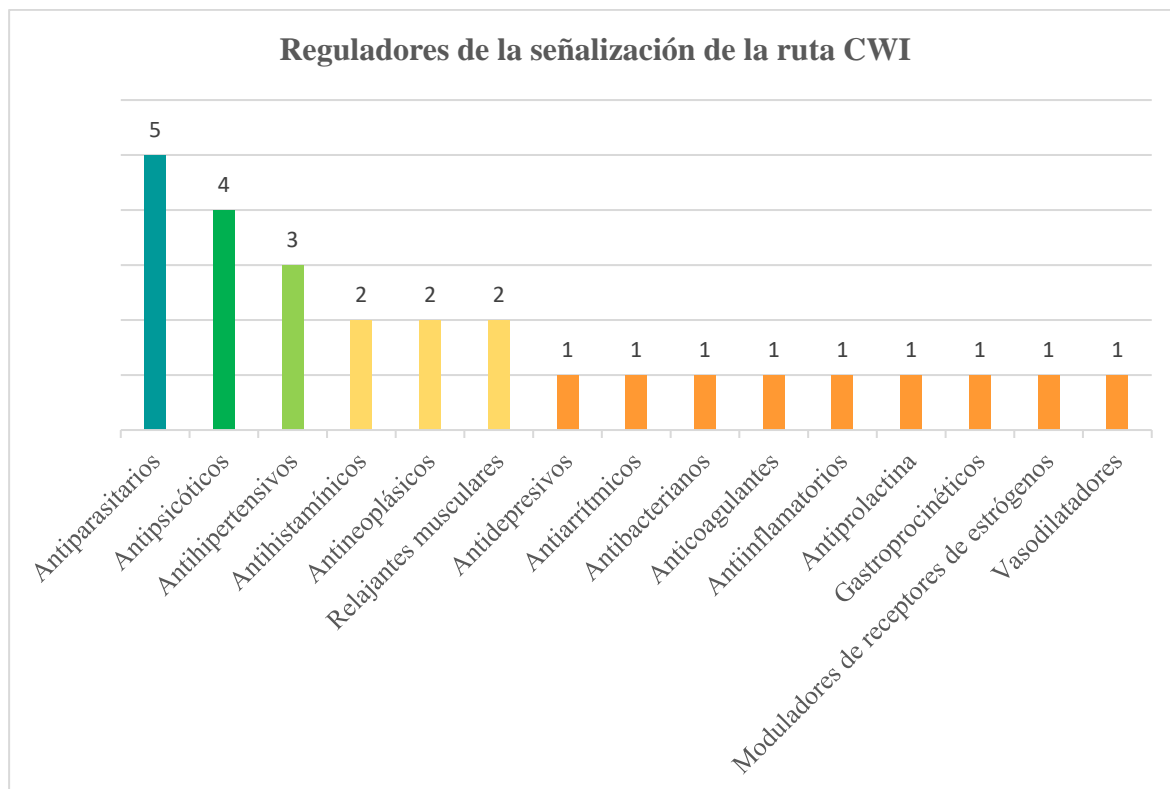


Figura 51. Gráfica de los compuestos de la colección que interfieren en la señalización de la ruta CWI y del IPAC en respuesta a RC permitiendo como mínimo un 25% el crecimiento de la cepa YSTH2 con el circuito integrado ordenados en función de su aplicación clínica más común.

Si bien es necesario realizar una caracterización más detallada del efecto de estos compuestos sobre la ruta CWI, es un buen punto de partida para demostrar que se pueden identificar fármacos que específicamente tengan a la ruta CWI como diana, bien por activarla o bien por inhibir su funcionamiento.

DISCUSIÓN

1. Utilidad del circuito genético sintético IPAC de amplificación de la señal de la ruta CWI como herramienta para el estudio de la señalización a través de esta ruta

El término retroalimentación se introdujo por primera vez para denotar la habilidad de un sistema para regularse a sí mismo empleando su resultado como parte de su activación. En los sistemas con retroalimentación negativa, una desviación del resultado se traduce en cambios en la dirección opuesta a la desviación original, es decir, el sistema es capaz de contrarrestar dicha desviación y volver a la situación inicial. Por el contrario, en los sistemas con retroalimentación positiva, una desviación en el resultado causa que este varíe todavía más en la dirección de la desviación original, dicho de otra forma, el sistema amplifica dicha desviación, alejándose de las condiciones iniciales. Consecuentemente, la retroalimentación negativa generalmente sirve para estabilizar un estado del sistema, mientras que la retroalimentación positiva amplifica las desviaciones generando cambios de estado (Mitrophanov and Groisman, 2008).

En las células, las respuestas celulares frente a un estímulo dependen de diversas propiedades del mismo, como su naturaleza, su duración, su frecuencia y su concentración. Así, las rutas de señalización están diseñadas no solo para interpretar la presencia o ausencia de estímulo, sino también para transmitir información cuantitativa sobre su intensidad y duración para adaptar el comportamiento celular (Behar and Hoffmann, 2010; Behar *et al.*, 2008). Estos parámetros están sometidos a circuitos de retroalimentación que regulan positiva y negativamente los sistemas de señalización, ajustando la respuesta celular a un estímulo dado y evitando de esta forma situaciones deletéreas. En las vías de transducción de señales mediadas por MAPKs, esta regulación es ejercida principalmente por las MAPKs, y ocurre a diferentes niveles de estas rutas (Vázquez-Ibarra *et al.*, 2020).

La introducción sintética de circuitos de retroalimentación que perturban las vías de señalización ha sido de gran utilidad para la caracterización de dichas rutas (Ingolia and Murray, 2007). Por ello, con el objetivo de ahondar en el estudio de la ruta de integridad celular, nuestro grupo de trabajo diseñó un circuito de retroalimentación positiva, denominado IPAC, que da lugar a la amplificación de la señalización a través de la misma en condiciones de estimulación, provocando una inhibición del crecimiento inducida por la hiperactivación de la ruta, incluso a concentraciones muy bajas del agente estimulante, lo que indica su elevada sensibilidad.

La caracterización en este trabajo de las diferencias entre las dos versiones del circuito, la que se encuentra clonada en dos vectores centroméricos y la integrada en el genoma de *S. cerevisiae*, muestra que esta segunda versión desencadena una inhibición del crecimiento más acusada que la primera en condiciones de estrés de pared en medios no selectivos. Además, el circuito portado en un vector plasmídico requiere medios con presión selectiva para inducir una inhibición del crecimiento significativa. El hecho de que este requerimiento sea dependiente específicamente de la auxotrofia complementada por cada uno de los plásmidos sugiere que únicamente tiene que ver con el mantenimiento del plásmido y no se debe a un efecto del medio sobre la activación del IPAC. A pesar de que se eligieron plásmidos centroméricos para minimizar su pérdida en medios no selectivos, la elevada toxicidad del circuito solo permite el crecimiento de aquellas células que los pierden tras 24-48 h de cultivo en situaciones de estrés. En cualquier caso, también parece que el circuito integrado genera una mayor activación de la ruta que el circuito en los vectores plasmídicos, a tenor de los ensayos realizados de fosforilación y activación transcripcional del gen *MLP1*. Es muy probable que desde el locus *HO*, donde está integrada esta construcción, haya un nivel basal de transcripción mayor de la versión hiperactiva del gen *MKK1* que desde la localización plasmídica.

El efecto inhibitorio del crecimiento causado por el IPAC se correlaciona con un aumento de la activación de la ruta CWI, reflejado en una mayor fosforilación de la MAPK Slt2 y en el incremento de la activación transcripcional de *MLP1* dependiente del factor de transcripción Rlm1, comparado con lo que ocurre en células carentes de IPAC. Más concretamente, nuestros resultados indican que un incremento sostenido de 2 o 3 veces sobre la respuesta normal mediada por la ruta CWI es suficiente para impedir el crecimiento, y que este efecto depende claramente de la integridad del circuito, ya que no ocurre si falta Rlm1.

Esta elevada sensibilidad del IPAC frente a estímulos de la ruta CWI junto con la facilidad de detección de la activación mediante sencillos ensayos de crecimiento convierten a este circuito sintético en una excelente herramienta para descubrir nuevas señales activadoras, así como moduladores sutiles de la señalización por esta ruta, cuya deficiencia no genera un fenotipo de sensibilidad claro y, por tanto, son difíciles de identificar en rastreos fenotípicos. Además, este circuito también presenta utilidad en el descubrimiento de fármacos, permitiendo encontrar nuevas moléculas antifúngicas que alteren específicamente la superficie celular. Utilizando este circuito, nuestro grupo identificó previamente una serie

de compuestos que activaban la ruta CWI, como el SDS y el sulfato de neomicina, cuyas respuestas hemos estudiado en el presente trabajo.

2. El eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG contribuye a la activación del módulo de MAPKs de la ruta CWI en respuesta al detergente aniónico SDS

Gracias al empleo del circuito IPAC, hemos determinado que el eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG juega un papel importante en la señalización celular en respuesta a SDS, conduciendo la señal hasta el módulo de MAPKs de la ruta CWI.

La co-activación por un mismo estímulo de las rutas de alta osmolaridad y de integridad celular ha sido descrita en múltiples ocasiones (Fuchs and Mylonakis, 2009; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010), y, en la mayoría de los casos, siguiendo un modelo de activación secuencial de ambas rutas. Uno de los primeros trabajos en proponer esto fue el realizado por Bermejo *et al.* 2008, en el que se observó que el daño en la pared celular originado por la exposición a zimoliasa es detectado por la rama SHO1 de la ruta HOG, y después la señal es transmitida a la ruta CWI a la altura de Pkc1, concluyendo en la activación transcripcional mediada por Rlm1. Así, en respuesta a zimoliasa se induce la expresión de genes de manera dependiente de Slt2, de Hog1 y de ambas MAPKs (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009). Del mismo modo, en el *checkpoint* de integridad de la pared celular, la ruta CWI interviene después de la ruta HOG, cuya rama SHO1 es la encargada de detectar el daño en la superficie celular (Sukegawa *et al.*, 2018). En condiciones de estrés hiperosmótico, se ha propuesto que es la acumulación de glicerol promovida por la activación de la ruta HOG la que genera un cambio en la presión de turgencia que es detectado por el mecanosensor Mid2, dando lugar a la puesta en marcha de la ruta CWI (García-Rodríguez *et al.*, 2005). Recientemente, se ha visto que, al igual que en el osmoestrés, durante la exposición celular a zimoliasa el elemento que conecta la señalización de ambas rutas de MAPKs es el glicerol (Laz *et al.*, 2020). Sin embargo, a pesar de que nuestros resultados estimulando con SDS también indican un entrecruzamiento de ambas rutas con activación secuencial desde el eje Ssk2-Pbs2-Hog1 hacia el módulo de MAPKs de la ruta CWI, en la situación de estrés inducido por SDS no parece que ocurra lo mismo que en zimoliasa o tras un choque hiperosmótico, ya que no observamos la típica respuesta transcripcional que promueve el incremento de glicerol intracelular, en nuestro caso, comprobada por la ausencia de inducción del gen del transportador de glicerol *STL1*.

Como se ha mencionado anteriormente, la quinasa Ssk2 está implicada en el reensamblaje del citoesqueleto de actina cuando se alcanza el balance osmótico tras un choque hiperosmótico a través de su interacción con la actina en el cuello de la yema (Yuzyuk *et al.*, 2002). Además, el cambio en la localización de Ssk2 desde el citoplasma hasta el cuello de la yema y la repolarización del citoesqueleto de actina que promueve dependen de varias proteínas del polarisoma, como Spa2, Pea2, Bud6, de la formina Bni1 y de la septina Shs1, pero no requieren a Pbs2 y Hog1 tras la activación de Ssk2 (Bettinger *et al.*, 2007; Yuzyuk and Amberg, 2003). Debido a que la función de Ssk2 afecta tanto a la repolarización de la actina como a la activación de la MAPK Slt2 inducida por SDS, Ssk2 podría ser una excelente candidata para coordinar estos dos procesos celulares. Asimismo, se ha determinado la existencia de proteínas que actúan como sensores de actina, como, por ejemplo, los factores de transcripción de mamíferos SRF y MRTF, que se encuentran en su conformación inactiva en el citoplasma a elevadas concentraciones de G-actina (Fernández-Barrera and Alonso, 2018). El hecho de que el tratamiento con SDS provoque la despolarización de la actina (Uesono *et al.*, 2008) de nuevo sugiere el papel de Ssk2 como sensor de actina en la detección de este estímulo y la posterior transmisión de la señal por el módulo de MAPKs de la ruta HOG hasta Slt2. Sin embargo, en el experimento realizado con el agente despolimerizador de actina latrunculina B, la fosforilación de Slt2 inducida por este compuesto no disminuye en el mutante *ssk2Δ*, por lo que en estas condiciones no parece que Ssk2 sea capaz de actuar como sensor de actina despolimerizada para la activación de la ruta CWI.

Por otro lado, en condiciones de osmoestrés, Ssk2/22 pueden dar lugar a la fosforilación de Hog1 y a su translocación al núcleo aun cuando están interrumpidas ambas ramas de la ruta HOG en el doble mutante *ssk1Δ ste11Δ*, lo que vuelve a plantear la existencia de un mecanismo alternativo de activación del par MAPKK-MAPK por estas MAPKKs independientemente de los elementos superiores de la ruta. No obstante, Hog1 así fosforilada no es capaz de activar la transcripción de los genes canónicos de respuesta a estrés osmótico, por lo que su fosforilación por mecanismos no canónicos es insuficiente para generar una respuesta protectora frente al estrés hiperosmótico (Vázquez-Ibarra *et al.*, 2018). La explicación biológica podría estar relacionada con una función de Pbs2-Hog1 independiente de la ruta de alta osmolaridad, como, por ejemplo, modular la actividad de otras rutas de señalización, como hemos observado para la ruta CWI tras el tratamiento con SDS. Esto está respaldado por el hecho de que Hog1 no entra al núcleo tras el tratamiento con SDS y que

no se induce la activación transcripcional de la ruta HOG, así como por nuestra demostración de las interacciones físicas entre los componentes de los módulos de MAPKs de las rutas HOG y CWI (Figura 52). La formación de estos complejos proteicos podría explicar también algunos de los entrecruzamientos previamente observados entre estas dos rutas.

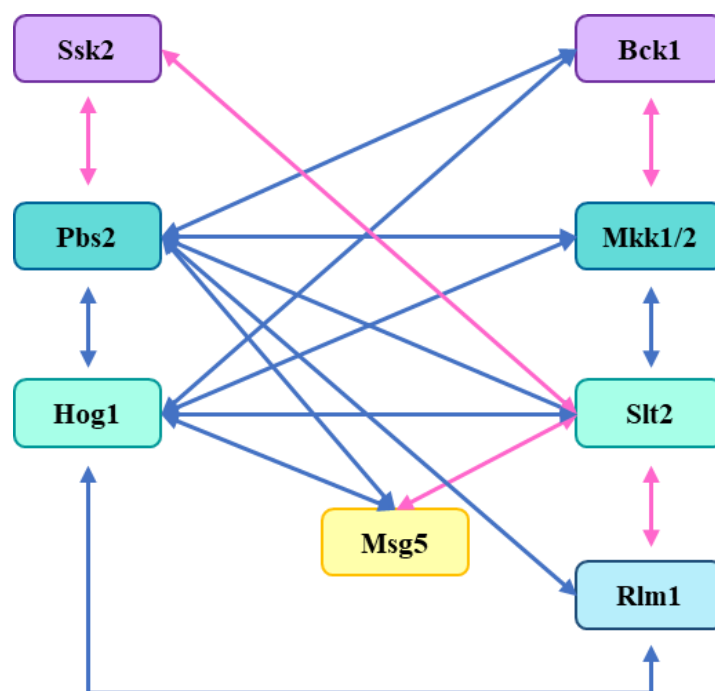


Figura 52. Esquema de las interacciones físicas entre los componentes de los módulos de MAPKs de las rutas HOG y CWI. En azul se muestran las interacciones observadas en este trabajo, y en rosa las que están descritas en la bibliografía pero que no se han ensayado.

Precisamente, la interacción física entre algunos elementos de estas dos rutas había sido observada mediante ensayos proteómicos a gran escala, como la interacción entre Bck1 y Hog1 y entre Ssk2 y Slf2 (Breitkreutz *et al.*, 2010; Janschitz *et al.*, 2019), lo que apoya nuestros resultados. Es interesante también resaltar la identificación de Bck1 como posible sustrato de Hog1 en un análisis fosfoproteómico (Romanov *et al.*, 2017). Asimismo, las MAPKs de las rutas CWI y HOG del hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, MpkA y SacA, se asocian entre sí en condiciones de estrés tanto osmótico como de pared celular (Manfiolli *et al.*, 2019), lo que indica que los mecanismos de entrecruzamiento entre estas rutas podrían estar conservados evolutivamente. En nuestro trabajo, no solo hemos detectado interacción entre Pbs2 y Hog1 con todos los componentes del módulo de MAPKs de la ruta CWI, sino también con la fosfatasa Msg5 y con el factor de transcripción Rlm1 de forma independiente de Slf2. Esto sugiere la capacidad de estas proteínas para formar un

macrocomplejo que permita tanto la transmisión de la señal como la regulación negativa de la señalización al mismo tiempo.

Los detergentes se caracterizan por ser moléculas anfipáticas, lo que les confiere la capacidad para solubilizar las membranas biológicas. El SDS tiene una naturaleza aniónica y, por tanto, desnaturalizante, que le permite interaccionar con moléculas tanto hidrofóbicas como hidrofílicas. Parece ser que su carácter aniónico es clave para la activación del circuito IPAC, pues otros detergentes no iónicos como el NP-40 y el Tritón X-100 no lo disparan, ni siquiera a concentraciones muy superiores a las que lo hace el SDS.

La toxicidad del SDS a altas concentraciones sobre la levadura parece deberse fundamentalmente a la permeabilización de las membranas celulares, lo que provoca la pérdida del balance iónico y la lisis celular. Sin embargo, a bajas concentraciones, similares a las empleadas en nuestro trabajo, se ha descrito que el SDS genera una perturbación de la membrana plasmática sin perder su integridad, lo que causa la despolarización de la actina, de forma similar a lo que ocurre tras un estrés térmico y diferente a lo que ocurre con detergentes catiónicos (Uesono *et al.*, 2008). Además, también se ha descrito que una baja concentración de SDS provoca una parada del ciclo celular antes de la transición G1/S, debido a que existe otro punto de control de la progresión del ciclo celular que detecta daños en la membrana plasmática e impide la división celular hasta que no se resuelve el problema (Kono *et al.*, 2016). Estos autores proponen que la parada en G1 tiene lugar por la degradación de Cdc6 y la estabilización de Sic1, e hipotetizan que tanto las rutas CWI y HOG como la ruta de señalización dependiente de Ca^{2+} podrían estar implicadas en dicho proceso (Kono and Ikui, 2017).

En un rastreo a gran escala realizado recientemente sobre la colección genómica de mutantes de *S. cerevisiae*, se encontraron a *wsc1Δ*, *tus1Δ*, *rom2Δ* y *pbs2Δ* entre los mutantes defectivos en proteínas de señalización que presentaban sensibilidad a SDS (Cao *et al.*, 2020). Curiosamente, no identificaron ninguno de los mutantes en el módulo de MAPKs de la ruta CWI, a diferencia de lo indicado por nuestros datos, que demuestran que Bck1 y Slt2 son esenciales para la supervivencia celular en condiciones de estrés por SDS. Esto, junto con la falta de sensibilidad que hemos visto en el mutante carente de Rom2, refleja una discrepancia entre ambos estudios, cuya explicación desconocemos, pero podría radicar en parte en las diferencias experimentales, como, por ejemplo, que dichos autores utilizan mutantes diploides y una concentración distinta de SDS. Es quizás más interesante

mentonar que este trabajo, al igual que previamente Sirisattha *et al.* (2004), sugiere que el SDS genera estrés oxidativo. Se sabe que el estrés inducido por el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) pone en marcha tanto a la ruta HOG (Haghnazari and Heyer, 2004) como a la ruta CWI, y que provoca la despolarización del citoesqueleto de actina (Hahn and Thiele, 2002; Jin *et al.*, 2013, 2014; Vilella *et al.*, 2005). Merece la pena resaltar que tal y como ocurre con SDS, y a diferencia del estrés osmótico, en estas condiciones tampoco hay translocación de Hog1 al núcleo (Lee *et al.*, 2017). Asimismo, el estrés oxidativo que origina la cloroquina induce la fosforilación y activación de Slt2 y Hog1 (Baranwal *et al.*, 2014), y el cadmio, que también aumenta los niveles intracelulares de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Thévenod and Lee, 2013), provoca la activación de ambas MAPKs (Jiang *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015). Todo ello apunta a que quizás sea el estrés oxidativo generado por SDS lo que promueve el entrecruzamiento detectado entre ambas rutas.

3. El aminoglucósido neomicina induce la activación de la ruta CWI, y la respuesta celular frente a este compuesto implica a varias rutas de transducción de señales

Otro de los compuestos estimuladores de la ruta CWI identificado por nuestro grupo gracias al uso del IPAC es el sulfato de neomicina (Alonso-Rodríguez, 2016). La neomicina es un antibiótico aminoglucósido inhibidor de la síntesis proteica de procariotas. Los antibióticos de esta familia se unen de forma irreversible a la subunidad ribosomal 30S, en concreto a un grupo conservado de nucleótidos del rRNA 16S, reduciendo la fidelidad de la traducción (Carter *et al.*, 2000; François *et al.*, 2005; Hermann, 2005). Nuestros resultados plantean que este antibiótico también podría interferir con la síntesis proteica de la levadura, ya que la inducción transcripcional de *MLPI* cuantificada por RT-qPCR y promovida por el tratamiento con este antibiótico no se traduce en un incremento proporcional al que ocurre con otros estímulos, como con el RC, en cuanto a la cantidad de β -galactosidasa producida a partir de la construcción reportera *pMLPI-lacZ*. De hecho, se ha demostrado que los aminoglucósidos se unen a los ribosomas de mamíferos, aunque con menor afinidad (Pérez-Fernández *et al.*, 2014). En particular, la unión a los ribosomas mitocondriales y, en concreto, al rRNA 12S parece ser una de las principales causas de la ototoxicidad característica de este tipo de fármacos (Fosso *et al.*, 2014; Qian and Guan, 2009). Tanto es así que esta reducida especificidad se está aprovechando en la búsqueda de nuevas aplicaciones de estos fármacos, incluso como antiprotozoarios o antifúngicos (Fosso *et al.*, 2014). Algunos de ellos, como G418 e higromicina B, son activos frente a hongos y células

de mamífero, y se usan para la selección de plásmidos que incluyen genes de resistencia a aminoglucósidos. En cualquier caso, esta inhibición de la traducción estaría limitando el funcionamiento del circuito y, en consecuencia, la amplificación de la señal que promueve. Más aun, muy probablemente sea una de las causas de la reducida activación de la ruta en comparación con otros estímulos, ya que en la ruta CWI opera un bucle de retroalimentación positiva que es esencial para la inducción transcripcional dependiente de Slt2 (García *et al.*, 2016).

A pesar de que la cicloheximida es capaz de inducir una leve activación de la ruta apreciable únicamente en presencia del IPAC, este efecto no ocurre con otros aminoglucósidos ensayados. Por tanto, la activación de la ruta CWI por la neomicina indica que este antibiótico ejerce alguna acción específica, ausente en el resto de inhibidores de la síntesis proteica. En ensayos *in vitro* se ha visto que la neomicina se une específicamente al PIP₂, provocando un aumento de la fluidez de las membranas (Gabev *et al.*, 1989; Schacht, 1976; Wang *et al.*, 1984). De hecho, se ha empleado a la neomicina como sonda para marcar este fosfolípido de membrana (Arbuzova *et al.*, 2000). En las células de mamíferos, muchas de las proteínas que interaccionan con la actina, como las forminas y el complejo Arp2/3, se unen al PIP₂ y son activadas o inactivadas por las concentraciones locales transitorias del mismo en la cara interna de la membrana plasmática. En consecuencia, el enmascaramiento del PIP₂ por neomicina disminuye la habilidad de la membrana para nuclear el ensamblaje de actina, alterando las interacciones de las proteínas de unión a actina sensibles al PIP₂ (Bucki *et al.*, 2019). Por tanto, una alteración del citoesqueleto de actina por esta causa podría subyacer a la activación de la ruta CWI en levaduras.

Asimismo, la neomicina neutraliza la carga negativa de este fosfoinosítido aniónico, interfiriendo con su interacción fisiológica con el dominio PH de la fosfolipasa C (PLC) cargado positivamente e inhibiendo la hidrólisis del PIP₂ por un proceso denominado apantallamiento de las cargas electrostáticas (Seo *et al.*, 2015). Además, la neomicina también es capaz de inhibir canales iónicos por distintos mecanismos (Huang *et al.*, 2015; Missiaen *et al.*, 1989; Niemeyer *et al.*, 2017), y el potencial de membrana puede afectar a la disposición de ciertos lípidos en la cara interna de la membrana plasmática, como los fosfolípidos aniónicos PS o PIP₂. Estos fosfolípidos influyen directamente en la organización de elementos de señalización celular anclados a la membrana, como las GTPasas de tipo Ras, y modulan la señalización de las rutas de MAPKs (Zhou *et al.*, 2015). Por ello, otra

posibilidad es que la neomicina esté alterando la actividad de componentes que participan en la señalización de la ruta CWI localizados en la membrana plasmática de la levadura a través del PIP₂. Por ejemplo, en *S. cerevisiae* Rho1 interacciona con el PIP₂ de la membrana plasmática (Yoshida *et al.*, 2009), de manera que la reducción de esta interacción podría suponer una pérdida de determinadas capacidades de Rho1, con repercusiones en la integridad de la pared celular que lleven a la activación de la ruta CWI. Es interesante señalar que según nuestros resultados la GEF de Rho1 Rom2 participa en la señalización por neomicina, lo cual plantea que la detección del estímulo debe ser a nivel de los receptores de superficie celular que interaccionan con esta GEF, como Wsc1 y Mid2, tal y como parecen apuntar también los ensayos que hemos realizado. De hecho, la pérdida de PIP₂ por sobreexpresión de la PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) humana promueve también la activación de la ruta de integridad celular vía Rom2 (Fernández-Acero *et al.*, 2015).

Otro aspecto interesante de nuestros resultados es el papel jugado por la proteína quinasa Pkh1 y la proteína de unión a PIP₂ y sensor de estrés de membrana Slm1 en la señalización por neomicina hacia la ruta CWI. Ambos componentes son importantes en la activación de Ypk1/2 en respuesta al estrés de membrana (Roelants *et al.*, 2017), por lo que parece que estas quinasas podrían jugar un papel relevante en la señalización promovida por la neomicina hacia la ruta CWI. La vía TORC2-Ypk1/2 regula la homeostasis de la membrana plasmática en respuesta a estrés (Eltschinger and Loewith, 2016). Por ejemplo, la asociación de Rho1 con la membrana plasmática es preservada gracias a la acción de la señalización TORC2-Ypk1/2 sobre la flipasa Lem3, encargada de la disposición espacial de los lípidos de membrana, como la PS, que asegura la localización de Rho1 en condiciones de estrés de membrana en las que disminuyen los niveles de PIP₂ (Hatakeyama *et al.*, 2017). Así, si se produjera un enmascaramiento de este fosfolípido por la neomicina, la falta de una correcta actividad de Ypk1/2 en el mutante *pkh1Δ* o en el mutante *slm1Δ* podría ser la causa de que los niveles de fosfo-Slt2 no se incrementen en respuesta al aminoglucósido, ya que Rho1 o Rom2 podrían ver alterada su localización en la membrana plasmática.

A su vez, la ruta CWI participa en el mantenimiento de la homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática, ya que la falta de componentes de esta ruta, como Tus1, Rho1, Pkc1, Bck1, Mkk1/2, Slt2 y Swi6, genera sensibilidad frente al ácido graso insaturado palmitoleico (Lockshon *et al.*, 2012), como ocurre con la sensibilidad a neomicina. De manera similar, la alteración de la composición lipídica de la membrana plasmática por la falta de inositol y la

presencia de colina en el medio conlleva la fosforilación de Slt2 y la activación transcripcional de genes de pared, esta vez mediada por Rlm1 (Nunez *et al.*, 2008). Además, en un mutante *slt2Δ* tanto el recambio como la síntesis de fosfatidilcolina están alterados, y los mutantes *pkc1Δ*, *bck1Δ* y *slt2Δ* muestran auxotrofia para el inositol, lo que indica un papel importante de la ruta de integridad en la homeostasis lipídica de la membrana plasmática (Nunez *et al.*, 2008). Por tanto, todas las evidencias apuntan a que la activación por neomicina de la ruta CWI se debe a que este aminoglucósido está alterando la homeostasis lipídica, y la falta de componentes clave de la ruta CWI impediría una parte importante de la respuesta celular a esta alteración.

Por otro lado, la ruta de alta osmolaridad también responde a cambios en la homeostasis de la membrana. Por ejemplo, la sobreexpresión de *OLE1*, que codifica una desaturasa que cataliza la conversión de ácidos grasos saturados en insaturados, provoca la activación constitutiva de Hog1 a través de Ssk2 (Nasution *et al.*, 2017). Nuestros datos indican que el módulo de MAPKs Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG también participa en la señalización estimulada por neomicina, lo cual refuerza la idea de que este aminoglucósido está interfiriendo con la membrana plasmática y que este módulo es relevante en la respuesta a estrés sobre esta estructura, como en el caso de la exposición a SDS.

En conclusión, la neomicina estaría provocando la activación coordinada de varias rutas de señalización, como la ruta CWI, la ruta mediada por Pkh1 y Slm1 y, en menor medida, la ruta HOG.

4. El rastreo de una colección comercial de fármacos mediante el uso del circuito IPAC ha permitido la identificación de nuevas moléculas estimuladoras y moduladoras negativas de la ruta CWI

Otra de las aplicaciones del circuito IPAC es la búsqueda de nuevos fármacos. En primer lugar, porque constituye una plataforma de ensayo muy sensible para la búsqueda de nuevas moléculas antifúngicas que alteren la pared celular o la membrana plasmática y, por tanto, sean capaces de activar al circuito. Y, en segundo lugar, permite el rastreo de inhibidores de la señalización por MAPKs en función de su habilidad para prevenir la inhibición del crecimiento de las células portadoras del IPAC sujetas a la estimulación de la ruta CWI. Además de las potenciales aplicaciones de estos últimos como fármacos antiproliferativos en humanos por la conservación de las rutas de tipo ERK, estos inhibidores de MAPKs

podrían emplearse de manera sinérgica con compuestos antifúngicos ya conocidos cuya diana sea la pared celular, gracias a su capacidad para interrumpir el mecanismo compensatorio dependiente de la ruta CWI.

Para realizar un rastreo farmacológico, se pueden utilizar colecciones de compuestos químicos o de productos naturales no conocidos e identificar posteriormente los activos para pasar a etapas posteriores del proceso, o bien seguir una estrategia de reposicionamiento de fármacos ya aprobados para otros usos, con el objetivo de ahorrar tiempo y coste (Ashburn and Thor, 2004; Pushpakom *et al.*, 2018).

En este trabajo hemos optado por rastrear la colección de reposicionamiento de fármacos *Prestwick Chemical Library*® de 1,280 compuestos. Recientemente, esta colección ha sido utilizada con éxito en la búsqueda de moléculas que presentan acción sinérgica con la anfotericina B frente a *Cryptococcus neoformans* y *Candida* spp. (Rossi *et al.*, 2020).

En nuestro rastreo, del total de compuestos, 46 (3.59%) impidieron el crecimiento celular de la levadura, independientemente del circuito. Como era de esperar, aproximadamente el 80% de estos compuestos presentaba actividad antifúngica ya descrita. Algunos, como los azoles y los polienos, son empleados terapéuticamente frente a micosis, mientras que la aplicación clínica más extendida de los otros compuestos no tiene relación con esta propiedad antifúngica, como es el caso del analgésico auranofina (Thangamani *et al.*, 2017), del agente antianginoso perhexilina (Delattin *et al.*, 2014), del antidepresivo sertralina (Gowri *et al.*, 2020; Treviño-Rangel *et al.*, 2016), de los antipsicóticos trifluoperazina (Eilam *et al.*, 1987; Montoya *et al.*, 2018) y flufenazina (Lu *et al.*, 2019; Sanglard *et al.*, 2003), de los antineoplásicos tamoxifeno (Dolan *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2015) y toremifeno (De Cremer *et al.*, 2014; Delattin *et al.*, 2014), del vasodilatador suloctidil (De Oliveira *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2017), del antiemético tietilperazina (Rossi *et al.*, 2020), del estimulante ovárico clomifeno (Dolan *et al.*, 2009), y del antibacteriano alexidina (Mamouei *et al.*, 2018). Esto ratifica la validez de la levadura *S. cerevisiae* como herramienta para realizar aproximaciones de tipo HTS (*High-Throughput Screening*) en la búsqueda de moléculas con acción antifúngica. Además, se ha observado por primera vez la actividad antimicótica de 8 compuestos, entre los que se encuentran el antidepresivo indatralina, el antihistamínico clemastina, el antiglaucoma demecario, los antipsicóticos metiotepina y zotepina, y los antibacterianos tosufloxacin, cloroxina y metilbecetio, lo que indica la posibilidad de

encontrar también nuevos compuestos con utilidad antifúngica mediante estas estrategias de reposicionamiento de fármacos.

Sin embargo, el objetivo principal del trabajo era hacer un rastreo dirigido para buscar moléculas con un mecanismo de acción concreto cuya diana fuera la superficie celular, fácilmente reconocibles por su capacidad para promover la inhibición del crecimiento propiciada por el funcionamiento del IPAC a través de la activación de la ruta CWI. Del total de compuestos ensayados, solo 13 (1.02%) inhibieron selectivamente el crecimiento de la cepa portadora del IPAC, denotando su especificidad sobre la ruta CWI.

Para algunos de estos compuestos ya se había descrito actividad antifúngica. La mayoría se sabe que interfieren con la membrana plasmática de diversas formas, lo que explicaría la activación del circuito al comprometer la integridad o propiedades de esta estructura, como hemos visto que ocurre con el SDS o con la neomicina. Por ejemplo, la butenafina tiene dos mecanismos de acción sobre la membrana fúngica. En primer lugar, inhibe específicamente la conversión del escualeno en 2,3-oxidoescualeno catalizada por la enzima escualeno epoxidasa, que provoca la alteración de los niveles celulares de ergosterol y la acumulación tóxica del escualeno en la membrana plasmática. Por otro lado, es capaz de interaccionar con los lípidos de membrana gracias a su naturaleza lipofílica, ejerciendo directamente un efecto deletéreo en la membrana plasmática (Mingeot-Leclercq *et al.*, 2001), lo que recuerda al efecto de la neomicina estudiado en nuestro trabajo. Esta característica de la butenafina juega un papel más importante en su actividad antifúngica que la inhibición de la biosíntesis de ergosterol (Iwatani *et al.*, 1993), y podría explicar la activación del circuito. El ifenprodil, empleado como vasodilatador, es un antagonista del receptor *N*-metil-D-aspartato (NMDA) de mamíferos (Tajima *et al.*, 2016), y se ha descrito que se une a la esteroil C₈-C₇ isomerasa (ERG2) de *S. cerevisiae*, interfiriendo en la biosíntesis del esteroil postescualeno y reduciendo el contenido de ergosterol en las células de levadura (Moebius *et al.*, 1996). La colistina es un polipéptido cíclico cargado positivamente con poder antibacteriano, porque altera la permeabilidad de la membrana celular externa de las bacterias Gram-negativas (Trimble *et al.*, 2016). Sin embargo, también posee cierta actividad antifúngica (Nicholls, 1970; Yousfi *et al.*, 2019), aunque los estudios sobre esta polimixina se centran en su uso combinado con otros antifúngicos, ya que la colistina tiene un efecto sinérgico en combinación con la equinocandina caspofungina (Adams *et al.*, 2016; Bidaud *et al.*, 2020; MacCallum *et al.*, 2013; Zeidler *et al.*, 2013), con la anfotericina B y con algunos azoles,

como el itraconazol y el fluconazol (Yousfi *et al.*, 2019). Por último, las fenotiazinas, como la perfenazina, la tioridazina, la triflupromazina o la clorpromazina, son un grupo de fármacos antipsicóticos que ejercen múltiples efectos sobre los hongos, por lo que podrían estar activando el circuito por distintas vías. No obstante, el hecho de que estas moléculas muestren actividad surfactante por su estructura anfifílica e interaccionen inespecíficamente con las membranas, provocando efectos parecidos al SDS (Uesono *et al.*, 2008, 2011), sugieren que este podría ser el mecanismo por el que activan al circuito.

Por otro lado, el antagonista de los receptores dopaminérgicos empleado como antipsicótico bromperidol muestra sinergia con distintos azoles en la inhibición del crecimiento de distintas especies de *Candida* y de *Aspergillus terreus* y de la formación de *biofilms* por *C. albicans*, probablemente a través de la inhibición del transportador MDR1 (*Multidrug-Resistant*), que actúa como bomba de expulsión disminuyendo la concentración intracelular de los azoles (Holbrook *et al.*, 2017). Desconocemos cuál es la causa por la que este compuesto puede estar activando la ruta CWI, pero el hecho de que otros antipsicóticos, como el clorprotixeno y el zuclopentixol, que bloquean selectivamente los receptores dopaminérgicos D2 al igual que el bromperidol se hayan seleccionado en el rastreo sugiere que podrían tener el mismo mecanismo de acción sobre los hongos.

Otro grupo de compuestos capaces de activar al IPAC actúa a nivel del DNA, entre los que se encuentran el antibacteriano carbadox, que presenta un efecto mutagénico en *S. cerevisiae* (Voogd *et al.*, 1980), y la 5-fluorocitosina, un antimicótico sintético que solo presenta actividad cuando entra en el interior celular, donde es convertido primero en 5-fluorouracilo y después en 5-fluorodeoxiuridina, que inhibe la síntesis de DNA y RNA (Vermes *et al.*, 2000). Sin embargo, su relativa baja eficacia antifúngica y la rápida aparición de resistencias (Costa *et al.*, 2015) ha propiciado su uso en combinación con otros antifúngicos (Mukherjee *et al.*, 2005). En esta línea, se ha visto que el estrés genotóxico activa a la ruta CWI de manera intracelular, ya que el aumento en la fosforilación de Slt2 se produce a expensas de la degradación proteosomal de la DSP Msg5 (Liu and Levin, 2018), como podría estar ocurriendo con estos fármacos de interferencia con el DNA.

Por último, el antiespástico bromuro de pinaverio bloquea los canales de calcio en células de mamífero (Godfraind *et al.*, 1986), pero no hay evidencias previas de su posible efecto sobre los hongos.

La terapia combinacional permite la acción sinérgica y por ello una mayor potencia que la de los fármacos empleados en monoterapia. Otros beneficios de la combinación de fármacos es la ampliación del espectro de acción, el incremento de la seguridad y la tolerancia por el uso de dosis más bajas que las de los agentes individuales, la prevención de la selección de organismos resistentes, y la reducción de costes debido al uso de cantidades reducidas de los fármacos (Lewis and Kontoyiannis, 2001). Por ello, el otro objetivo del rastreo fue analizar qué compuestos eran capaces de cortar la señalización del RC hacia el IPAC, habilitando el crecimiento celular; dicho de otra forma, buscar moléculas que interfieran con la señalización de la ruta CWI para poder emplearse en combinación con otros antifúngicos que ataquen a la superficie celular y potenciar así el efecto de los mismos al impedir el mecanismo compensatorio que dispara esta ruta. La ventaja de seleccionar compuestos que dejen crecer a las levaduras es que se asegura una baja toxicidad general de estos sobre las células eucarióticas. Una prueba de la validez de esta estrategia combinatoria es la reciente identificación de la puupehenona, una quinona sesquiterpénica de origen marino que potencia el efecto de la caspofungina al impedir la activación de la ruta CWI en respuesta a este inhibidor de la síntesis de la pared celular, mediante el bloqueo de la formación del complejo Hsp90-Cdc37 necesario para la activación de Slt2 (Tripathi *et al.*, 2020).

En este rastreo, 27 compuestos permitieron el crecimiento de la cepa portadora del circuito en presencia de RC, por lo que de alguna forma están evitando la respuesta celular frente a este agente de unión a quitina mediada por la ruta CWI.

Algunos de estos compuestos, como el antipsicótico aripiprazol (Rajasekharan *et al.*, 2019), el modulador del receptor de estrógenos raloxifeno (Laggner *et al.*, 2005) y el antihipertensivo doxazosina (Rabelo *et al.*, 2019), se han relacionado con la interferencia de la síntesis de ergosterol, al igual que los azoles, en la levadura patógena oportunista *Candida albicans*, mientras que el antimalárico amodiaquina inhibe la biosíntesis de fosfatidilcolina (Garg *et al.*, 2015). Una posible explicación es que estos compuestos que afectan a la biosíntesis de ergosterol o de fosfolípidos estén disminuyendo de algún modo la capacidad de detección de los mecanosensores de la ruta CWI, por ejemplo, alterando su localización debido a cambios en las propiedades de la membrana plasmática, por lo que no se estaría detectando correctamente el daño provocado por RC sobre la pared celular.

Es también interesante destacar que otro de los compuestos identificados en el rastreo de inhibidores del IPAC es el antihipertensivo carvedilol, que, aunque se desconoce su

actividad sobre la célula fúngica, se ha descrito que muestra sinergismo con el fluconazol frente a *C. albicans* (Kaneko *et al.*, 2013). Dado que la ruta CWI está conservada en *S. cerevisiae*, podría estar interfiriendo de alguna manera con ella. Esta sinergia con azoles también se ha observado para otros compuestos positivos de este rastreo, como los antihistamínicos astemizol (Vu and Gelli, 2010) y terfenadina (Dennis and Garneau-Tsodikova, 2019), que son ligandos del canal de potasio humano hERG, y podrían estar afectando al transporte de este ion en la célula de levadura (Molbaek *et al.*, 2015), o el antipsicótico reserpina, que es un modulador de la actividad del transportador MDR1 en *C. albicans* (Clark *et al.*, 1996), y aumenta la sensibilidad de este hongo al fluconazol y la potencia aún más combinado con clorpromazina (Bulatova and Darwish, 2008). Más interesante todavía, el antiparasitario quinacrina muestra sinergismo con la caspofungina, en concordancia con nuestro rastreo. Este compuesto alcaliniza las vacuolas e interfiere con la endocitosis, secreción y degradación de proteínas en *C. albicans* (Kulkarny *et al.*, 2014), lo que podría estar alterando el funcionamiento de la ruta CWI.

Otros de los compuestos identificados interrumpen las rutas de transducción de señales en mamíferos, por lo que es probable que también lo estén haciendo en la levadura, como el antineoplásico gefitinib, que induce apoptosis y bloquea las rutas de señalización implicadas en la proliferación y supervivencia de las células (Wu *et al.*, 2019), o el antihelmíntico pirvinio, que atenúa la señalización de las rutas WNT y Hedgehog, así como la de las rutas PI3K-Akt e Hippo (Momtazi-Borojeni *et al.*, 2018). En levadura, se ha observado recientemente que la combinación pirvinio-azol regula negativamente la expresión de *TOR* y *HSP90*, al contrario que el efecto que ejercen estos compuestos por separado (Sun *et al.*, 2020). La inhibición de Hsp90 impide las respuestas de estrés dependientes de la calcineurina (Juvvadi *et al.*, 2014), y, como ya se ha comentado anteriormente, esta chaperona es responsable de la actividad de MAPKs como Slt2 y Hog1 (Hawle *et al.*, 2007; Millson *et al.*, 2005). Por tanto, es probable que el mecanismo por el cual el pirvinio contrarresta el efecto del circuito tenga relación con su acción sobre Hsp90, como ocurre en el caso antes citado de la puupehenona (Tripathi *et al.*, 2020).

Al igual que el pirvinio, algunos compuestos positivos en este rastreo modulan negativamente el eje de señalización Ca^{2+} /calmodulina-calcineurina, que actúa paralelamente a la ruta de integridad en respuesta a estrés, como el antipsicótico fluspirilen, que se une a la calmodulina de *C. neoformans*, inhibiendo su crecimiento (Butts *et al.*, 2013),

DISCUSIÓN

y el vasodilatador prenilamina, un antagonista de los canales de Ca^{2+} que también interacciona con la calmodulina en mamíferos (Lamers *et al.*, 1985).

Aunque aún preliminares, los resultados del rastreo indican que el circuito IPAC proporciona un método fiable y sencillo para la búsqueda de nuevos compuestos activadores e inhibidores de la ruta CWI.

CONCLUSIONES

1. El circuito IPAC (*Integrity Pathway Activation Circuit*) de retroalimentación positiva promueve la inhibición del crecimiento en condiciones de estimulación de la ruta CWI debido a una hiperactivación de Slt2 de manera dependiente de la intensidad del estímulo.
2. La integración genómica del IPAC genera una mayor fosforilación de la MAPK Slt2 y una mayor actividad transcripcional de la ruta CWI mediada por el factor de transcripción Rlm1 que el IPAC en un vector centromérico.
3. En la señalización del detergente aniónico SDS, el eje Ssk2-Pbs2-Hog1 de la ruta HOG participa en la activación del módulo de MAPKs de la ruta CWI, si bien en estas condiciones no se produce la translocación al núcleo de la MAPK Hog1 ni la activación transcripcional de la ruta HOG.
4. Las proteínas del módulo de MAPKs de la ruta HOG Pbs2 y Hog1 interaccionan físicamente con todos los componentes del módulo de MAPKs de la ruta CWI, lo que apoya la existencia del entrecruzamiento entre estas dos rutas mediante la formación de un macrocomplejo de señalización.
5. A diferencia de otros inhibidores de la síntesis proteica, el aminoglucósido neomicina activa al circuito IPAC inhibiendo el crecimiento celular, por lo que se trata de un estímulo de la ruta CWI.
6. En presencia de neomicina, la respuesta transcripcional dependiente de Rlm1 se activa débilmente, lo que explica una menor activación del IPAC en comparación con la que provoca el rojo Congo. Esto podría deberse en parte a la inhibición de la síntesis proteica causada por este aminoglucósido.
7. En la activación de Slt2 por neomicina participan, además de los elementos canónicos de la ruta CWI, el módulo Ssk2-Pbs2-Hog1, la proteína quinasa Pkh1 y la proteína de unión a PIP₂ Slm1.
8. En el rastreo con el circuito IPAC de los 1,280 compuestos de la colección *Prestwick Chemical Library*®, un 3.6% del total mostró actividad antifúngica independientemente del circuito, un 1.0% fue capaz de estimular la ruta CWI y un 2.1% inhibió la señalización a través de dicha ruta.

CONCLUSIONES

9. El circuito IPAC es una herramienta muy útil para la identificación de moléculas con potencial actividad terapéutica cuya diana sea la superficie celular fúngica o las rutas de MAPKs.

CONCLUSIONS

1. The synthetic positive feedback circuit IPAC (Integrity Pathway Activation Circuit) inhibits growth under CWI pathway stimulation due to Slt2 hyperactivation in a stimulus intensity-dependent manner.
2. The IPAC genomic integration promotes higher MAPK Slt2 phosphorylation levels and CWI pathway transcriptional activation mediated by the transcription factor Rlm1 than the IPAC expressed from centromeric vectors.
3. In the SDS-induced signalling, the HOG pathway Ssk2-Pbs2-Hpg1 axis participates in the CWI pathway MAPK module activation, even though under these conditions there is neither nuclear translocation of the MAPK Hog1 nor HOG pathway transcriptional activation.
4. The HOG pathway MAPK module proteins Pbs2 and Hog1 physically interact with all the components of the CWI pathway MAPK module, which supports the existence of crosslinking between these two pathways through the formation of a signalling macrocomplex.
5. In contrast with other protein synthesis inhibitors, the aminoglycoside neomycin activates the IPAC circuit and inhibits cell growth, proving its ability to stimulate the CWI pathway.
6. The Rlm1-dependent transcriptional response is slightly activated in the presence of neomycin, which explains the lower activation of the IPAC as compared to that elicited by Congo red. This could be in part due to the protein synthesis inhibition caused by this aminoglycoside.
7. In addition to the canonical CWI pathway elements, the Ssk2-Pbs2-Hog1 module, the protein kinase Pkh1, and the PIP₂ binding protein Slm1 also participate in Slt2 activation induced by neomycin.
8. In a screening of 1,280 compounds from the *Prestwick Chemical Library*® using yeast cells bearing the IPAC, 3.6% of the total showed antifungal activity independently of the circuit, 1.0% stimulated the CWI pathway, and 2.1% inhibited signalling through this pathway.
9. The IPAC circuit is a useful tool for the identification of molecules with antifungal therapeutic potential whose target is either the cell surface or a MAPK signalling pathway.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, E.K., Ashcraft, D.S., and Pankey, G.A. (2016). *In vitro* synergistic activity of caspofungin plus polymyxin B against fluconazole-resistant *Candida glabrata*. *Am. J. Med. Sci.* 351, 265–270.
- Aguilar-Uscanga, B., and François, J.M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 268–274.
- Ahmadpour, D., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Babazadeh, R., Dahal, S., Migocka, M., Andersson, M., Wysocki, R., Tamás, M.J., and Hohmann, S. (2016). The mitogen-activated protein kinase Slt2 modulates arsenite transport through the aquaglyceroporin Fps1. *FEBS Lett.* 590, 3649–3659.
- Ai, W., Bertram, P.G., Tsang, C.K., Chan, T.F., and Zheng, X.F.S. (2002). Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol. Cell* 10, 1295–1305.
- Alic, N., Higgins, V.J., Pichova, A., Breitenbach, M., and Dawes, I.W. (2003). Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 278, 41849–41855.
- Alonso-Rodríguez, E. (2016). Identificación de compuestos activadores, proteínas moduladoras y sustratos de la MAPK Slt2 de la ruta de integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis doctoral. Universidad Complutense.
- Alonso-Rodríguez, E., Fernández-Piñar, P., Sacristán-Reviriego, A., Molina, M., and Martín, H. (2016). An analog-sensitive version of the protein kinase Slt2 allows identification of novel targets of the yeast cell wall integrity pathway. *J. Biol. Chem.* 291, 5461–5472.
- Alsteens, D., Dupres, V., Yunus, S., Latgé, J.P., Heinisch, J.J., and Dufreïne, Y.F. (2012). High-resolution imaging of chemical and biological sites on living cells using peak force tapping atomic force microscopy. *Langmuir* 28, 16738–16744.
- Amberg, D.C., and Burke, D.J. (2016). Classical genetics with *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, 413–421.
- Andrews, P.D., and Stark, M.J.R. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.* 113, 2685–2693.
- Antonsson, B., Montessuit, S., Friedli, L., Payton, M.A., and Paravicini, G. (1994). Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *J. Biol. Chem.* 269, 16821–16828.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1993) *Current protocols in molecular biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- Arbuzova, A., Martushova, K., Hangyás-Mihályné, G., Morris, A.J., Ozaki, S., Prestwich, G.D., and McLaughlin, S. (2000). Fluorescently labeled neomycin as a probe of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in membranes. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1464, 35–48.
- Arroyo, J., Bermejo, C., García, R., and Rodríguez-Peña, J.M. (2009). Genomics in the detection of damage in microbial systems: Cell wall stress in yeast. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 44–46.

Ashburn, T.T., and Thor, K.B. (2004). Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 673–683.

Audhya, A., and Emr, S.D. (2002). Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev. Cell* 2, 593–605.

Audhya, A., Loewith, R., Parsons, A.B., Gao, L., Tabuchi, M., Zhou, H., Boone, C., Hall, M.N., and Emr, S.D. (2004). Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P₂ effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 23, 3747–3757.

Babele, P.K., Thakre, P.K., Kumawat, R., and Tomar, R.S. (2018). Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* 213, 65–75.

Babour, A., Bicknell, A.A., Tourtellotte, J., and Niwa, M. (2010). A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* 142, 256–269.

Baetz, K., and Andrews, B. (1999). Regulation of cell cycle transcription factor Swi4 through auto-inhibition of DNA binding. *Mol. Cell. Biol.* 19, 6729–6741.

Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., and Andrews, B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol. Cell. Biol.* 21, 6515–6528.

Bähler, J. (2005). Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu. Rev. Genet.* 39, 69–94.

Baltanas, R., Bush, A., Couto, A., Durrieu, L., Hohmann, S., and Colman-Lerner, A. (2013). Pheromone-induced morphogenesis improves osmoadaptation capacity by activating the HOG MAPK pathway. *Sci. Signal.* 6, ra26–ra26.

Bandyopadhyay, S., Mehta, M., Kuo, D., Sung, M.K., Chuang, R., Jaehnig, E.J., Bodenmiller, B., Licon, K., Copeland, W., Shales, M., et al. (2010). Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science* 330, 1385–1389.

Baranwal, S., Azad, G.K., Singh, V., and Tomar, R.S. (2014). Signaling of chloroquine-induced stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* requires the Hog1 and Slt2 mitogen-activated protein kinase pathways. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5552–5566.

Bartlett, K., and Kim, K. (2014). Insight into Tor2, a budding yeast microdomain protein. *Eur. J. Cell Biol.* 93, 87–97.

Behar, M., and Hoffmann, A. (2010). Understanding the temporal codes of intra-cellular signals. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 684–693.

Behar, M., Hao, N., Dohlman, H.G., and Elston, T.C. (2008). Dose-to-duration encoding and signaling beyond saturation in intracellular signaling networks. *PLoS Comput. Biol.* 4.

- Berchtold, D., and Walther, T.C. (2009). TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Mol. Biol. Cell* 20, 1565–1575.
- Berchtold, D., Piccolis, M., Chiaruttini, N., Riezman, I., Riezman, H., Roux, A., Walther, T.C., and Loewith, R. (2012). Plasma membrane stress induces relocalization of Slm proteins and activation of TORC2 to promote sphingolipid synthesis. *Nat. Publ. Gr.* 14, 542–547.
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Rodríguez de la Concepción, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F., and Arroyo, J. (2008). The Sequential Activation of the Yeast HOG and SLT2 Pathways Is Required for Cell Survival to Cell Wall Stress. *Mol. Biol. Cell* 19, 1113–1124.
- Bermejo, C., García, R., Straede, A., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., Heinisch, J.J., and Arroyo, J. (2010). Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Omi. A J. Integr. Biol.* 14, 679–688.
- Bettinger, B.T., Clark, M.G., and Amberg, D.C. (2007). Requirement for the polarisome and formin function in Ssk2p-mediated actin recovery from osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1648, 1637–1648.
- Bidaud, A.L., Djenontin, E., Botterel, F., Chowdhary, A., and Dannaoui, E. (2020). Colistin interacts synergistically with echinocandins against *Candida auris*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 55, 105901.
- Bilsland-Marchesan, E., Ariño, J., Saito, H., Sunnerhagen, P., and Posas, F. (2000). Rck2 kinase is a substrate for the osmotic stress-activated mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol. Cell. Biol.* 20, 3887–3895.
- Blount, B.A., Weenink, T., and Ellis, T. (2012). Construction of synthetic regulatory networks in yeast. *FEBS Lett.* 586, 2112–2121.
- Bonilla, M., and Cunningham, K.W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* 14, 4296–4305.
- Vanden Bossche, H., Engelen, M., and Rochette, F. (2003). Antifungal agents of use in animal health - Chemical, biochemical and pharmacological aspects. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26, 5–29.
- Bouwman, J., Kiewiet, J., Lindenbergh, A., van Eunen, K., Siderius, M., and Bakker, B.M. (2011). Metabolic regulation rather than de novo enzyme synthesis dominates the osmo-adaptation of yeast. *Yeast* 28, 43–53.
- Breeden, L.L. (2003). Periodic transcription: A cycle within a cycle. *Curr. Biol.* 13, 31–38.
- Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J.R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., Lin, Z.Y., Breitkreutz, B.J., Stark, C., Liu, G., et al. (2010). A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science* 328, 1043–1046.
- Bryan, B.A., Knapp, G.S., Bowen, L.M., and Polymenis, M. (2004). The UV response in *Saccharomyces cerevisiae* involves the mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Curr. Microbiol.* 49, 32–34.

- Bucki, R., Wang, Y.H., Yang, C., Kandy, S.K., Fatunmbi, O., Bradley, R., Pogoda, K., Svitkina, T., Radhakrishnan, R., and Janmey, P.A. (2019). Lateral distribution of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in membranes regulates formin- and ARP2/3-mediated actin nucleation. *J. Biol. Chem.* 294, 4704–4722.
- Bulatova, N.R., and Darwish, R.M. (2008). Effect of chemosensitizers on minimum inhibitory concentrations of fluconazole in *Candida albicans*. *Med. Princ. Pract.* 17, 117–121.
- Bultynck, G., Heath, V.L., Majeed, A.P., Galan, J.-M., Haguenaer-Tsapis, R., and Cyert, M.S. (2006). Slm1 and Slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol. Cell. Biol.* 26, 4729–4745.
- Bush, A., Chernomoretz, A., Yu, R., Gordon, A., and Colman-Lerner, A. (2012). Using Cell-ID 1.4 with R for microscope-based cytometry. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 100, 1–27.
- Butts, A., Didone, L., Koselny, K., Baxter, B.K., Chabrier-rosello, Y., Wellington, M., and Krysan, D.J. (2013). A repurposing approach identifies off-patent drugs with fungicidal cryptococcal activity, a common structural chemotype, and pharmacological properties relevant to the treatment of cryptococcosis. *12*, 278–287.
- Cabib, E., Drgonová, J., and Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 307–333.
- Cao, C., Cao, Z., Yu, P., and Zhao, Y. (2020). Genome-wide identification for genes involved in sodium dodecyl sulfate toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol.* 20, 1–11.
- Carmody, S.R., Tran, E.J., Apponi, L.H., Corbett, A.H., and Wente, S.R. (2010). The mitogen-activated protein kinase Slt2 regulates nuclear retention of non-heat shock mRNAs during heat shock-induced stress. *Mol. Cell. Biol.* 30, 5168–5179.
- Carter, A.P., Clemons, W.M., Brodersen, D.E., Morgan-Warren, R.J., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V. (2000). Functional insights from the structure of the 30S ribosomal subunit and its interactions with antibiotics. *Nature* 407, 340–348.
- Casagrande, V., Del Vescovo, V., Militti, C., Mangiapelo, E., Frontali, L., Negri, R., and Bianchi, M.M. (2009). Cesium chloride sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: An interplay among the HOG and CWI MAPK pathways and the transcription factor Yaf9. *FEMS Yeast Res.* 9, 400–410.
- Casamayor, A., Torrance, P.D., Kobayashi, T., Thorner, J., and Alessi, D.R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.* 9, 186–197.
- Chen, R.E., and Thorner, J. (2007). Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1311–1340.
- Chen, D.C., Yang, B.C., and Kuo, T.T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* 21, 83–84.

- Chen, Y., Feldman, D.E., Deng, C., Brown, J.A., De Giacomo, A.F., Gaw, A.F., Shi, G., Le, Q.T., Brown, J.M., and Koong, A.C. (2005). Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cancer Res.* 3, 669–677.
- Claret, S., Gatti, X., Doignon, F., Thoraval, D., and Crouzet, M. (2005). The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 4, 1375–1386.
- Clark, F.S., Parkinson, T., Hitchcock, C.A., and Gow, N.A.R. (1996). Correlation between rhodamine 123 accumulation and azole sensitivity in *Candida* species: Possible role for drug efflux in drug resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 419–425.
- Clotet, J., and Posas, F. (2007). Control of cell cycle in response to osmostress: Lessons from yeast. *Methods Enzymol.* 428, 63–76.
- Colbère-Garapin, F., Horodniceanu, F., Kourilsky, P., and Garapin, A.C. (1981). A new dominant hybrid selective marker for higher eukaryotic cells. *J. Mol. Biol.* 150, 1–14.
- Collister, M., Didmon, M.P., MacIsaac, F., Stark, M.J., MacDonald, N.Q., and Keyse, S.M. (2002). YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* 527, 186–192.
- Colman-Lerner, A., Gordon, A., Serra, E., Chin, T., Resnekov, O., Endy, D., Pesce, C.G., and Brent, R. (2005). Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system. *Nature* 437, 699–706.
- Córcoles-Sáez, I., Ballester-Tomas, L., De La Torre-Ruiz, M.A., Prieto, J.A., and Randez-Gil, F. (2012). Low temperature highlights the functional role of the cell wall integrity pathway in the regulation of growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 446, 477–488.
- Costa, C., Ponte, A., Pais, P., Santos, R., Cavalheiro, M., Yaguchi, T., Chibana, H., and Teixeira, M.C. (2015). New mechanisms of flucytosine resistance in *C. glabrata* unveiled by a chemogenomics analysis in *S. cerevisiae*. *PLoS One* 10, 1–18.
- De Cremer, K., Delattin, N., De Brucker, K., Peeters, A., Kucharíková, S., Gerits, E., Verstraeten, A.N., Michiels, J., Van Dijck, P., Cammue, B.P.A., et al. (2014). Oral administration of the broad-spectrum antibiofilm compound toremifene inhibits *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* biofilm formation *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7606–7610.
- Cullen, P.J., Jr, W.S., Graham, E., Irick, M.M., Olden, E.K. Van, Neal, C., Delrow, J., Bardwell, L., and Sprague, G.J. (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev.* 18, 1695–1708.
- Dardalhon, M., Agoutin, B., Watzinger, M., and Averbek, D. (2009). Slt2 (Mpk1) MAP kinase is involved in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 8-methoxypsoralen plus UVA. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 95, 148–155.

- Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E., and Gustin, M.C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast: Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* 270, 30157–30161.
- Davies, J., and Jimenez, A. (1980). A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 1089–1092.
- Delarue, M., Poterewicz, G., Hoxha, O., Choi, J., Yoo, W., Kayser, J., Holt, L., Hallatschek, O., and Weitz, D.A. (2017). SCWISH network is essential for survival under mechanical pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13465–13470.
- Delattin, N., De brucker, K., Vandamme, K., Meert, E., Marchand, A., Chaltin, P., Cammue, B.P.A., and Thevissen, K. (2014). Repurposing as a means to increase the activity of amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 1035–1044.
- Delley, P.A., and Hall, M.N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J. Cell Biol.* 147, 163–174.
- Denis, V., and Cyert, M.S. (2005). Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot. Cell* 4, 36–45.
- Dennis, E.K., and Garneau-Tsodikova, S. (2019). Synergistic combinations of azoles and antihistamines against *Candida* species *in vitro*. *Med. Mycol.* 57, 874–884.
- Dey, P., Su, W.M., Han, G.S., and Carman, G.M. (2017). Phosphorylation of lipid metabolic enzymes by yeast protein kinase C requires phosphatidylserine and diacylglycerol. *J. Lipid Res.* 58, 742–751.
- Dodou, E., and Treisman, R. (1997). The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1848–1859.
- Dolan, K., Montgomery, S., Buchheit, B., DiDone, L., Wellington, M., and Krysan, D.J. (2009). Antifungal activity of tamoxifen: *In vitro* and *in vivo* activities and mechanistic characterization. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 3337–3346.
- Van Drogen, F., and Peter, M. (2002). Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr. Biol.* 12, 1698–1703.
- Van Drogen, F., O'Rourke, S.M., Stucke, V.M., Jaquenoud, M., Neiman, A.M., and Peter, M. (2000). Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling *in vivo*. *Curr. Biol.* 10, 630–639.
- Duina, A.A., Miller, M.E., and Keeney, J.B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: A primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics* 197, 33–48.
- Dunayevich, P., Baltanás, R., Clemente, J.A., Couto, A., Sapochnik, D., Vasen, G., and Colman-Lerner, A. (2018). Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway. *Sci. Rep.* 8, 1–15.

- Dupres, V., Alsteens, D., Wilk, S., Hansen, B., Heinisch, J.J., and Dufrêne, Y.F. (2009). The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring *in vivo*. *Nat. Chem. Biol.* 5, 857–862.
- Eilam, Y., Polacheck, I., Ben-Gigi, G., and Chernichovsky, D. (1987). Activity of phenothiazines against medically important yeasts. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 834–836.
- Ekiel, I., Sulea, T., Jansen, G., Kowalik, M., Minailiuc, O., Cheng, J., Harcus, D., Cygler, M., Whiteway, M., and Wu, C. (2009). Binding the atypical RA domain of Ste50p to the unfolded Opy2p cytoplasmic tail is essential for the High-Osmolarity Glycerol pathway. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5117–5126.
- Eltschinger, S., and Loewith, R. (2016). TOR complexes and the maintenance of cellular homeostasis. *Trends Cell Biol.* 26, 148–159.
- Fadri, M., Daquinag, A., Wang, S., Xue, T., and Kunz, J. (2005). The Pleckstrin Homology Domain Proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol. Biol. Cell* 16, 1883–1900.
- Fassler, J.S., and West, A.H. (2010). Genetic and biochemical analysis of the SLN1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. In Bone, pp. 291–317.
- Fernández-Acero, T., Rodríguez-Escudero, I., Molina, M., and Cid, V.J. (2015). The yeast cell wall integrity pathway signals from recycling endosomes upon elimination of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate by mammalian phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell. Signal.* 27, 2272–2284.
- Fernández-Barrera, J., and Alonso, M.A. (2018). Coordination of microtubule acetylation and the actin cytoskeleton by formins. *Cell. Mol. Life Sci.* 75, 3181–3191.
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H., and Silver, P.A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin β homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* 17, 5606–5614.
- Flández, M., Cosano, I.C., Nombela, C., Martín, H., and Molina, M. (2004). Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast Cell Integrity Pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 11027–11034.
- Fosso, M.Y., Li, Y., and Garneau-Tsodikova, S. (2014). New trends in aminoglycosides use. *Medchemcomm* 5, 1075–1091.
- François, B., Russell, R.J.M., Murray, J.B., Aboul-ela, F., Masquida, B., Vicens, Q., and Westhof, E. (2005). Crystal structures of complexes between aminoglycosides and decoding A site oligonucleotides: Role of the number of rings and positive charges in the specific binding leading to miscoding. *Nucleic Acids Res.* 33, 5677–5690.
- Friant, S., Lombardi, R., Schmelzle, T., Hall, M.N., and Riezman, H. (2001). Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J.* 20, 6783–6792.
- Fuchs, B.B., and Mylonakis, E. (2009). Our paths might cross: The role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot. Cell* 8, 1616–1625.

- Furukawa, K., and Hohmann, S. (2013). Synthetic biology: Lessons from engineering yeast MAPK signalling pathways. *Mol. Microbiol.* 88, 5–19.
- Gabev, E., Kasianowicz, J., Abbott, T., and McLaughlin, S. (1989). Binding of neomycin to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂). *BBA - Biomembr.* 979, 105–112.
- Gallego, O., Betts, M.J., Gvozdenovic-Jeremic, J., Maeda, K., Matetzki, C., Aguilar-Gurreri, C., Beltran-Alvarez, P., Bonn, S., Fernández-Tornero, C., Jensen, L.J., et al. (2010). A systematic screen for proteing-lipid interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Syst. Biol.* 6.
- García-Rodríguez, L.J., Valle, R., Durán, Á., and Roncero, C. (2005). Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett.* 579, 6186–6190.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 15183–15195.
- García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Bermejo, C., Nombela, C., and Arroyo, J. (2009). The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 284, 10901–10911.
- García, R., Sanz, A.B., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., and Arroyo, J. (2016). Rlm1 mediates positive autoregulatory transcriptional feedback that is essential for Slt2-dependent gene expression. *J. Cell Sci.* 129, 1649–1660.
- García, R., Bravo, E., Díez-Muñiz, S., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2017). A novel connection between the cell wall integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. *Sci. Rep.* 7, 1–15.
- Garg, A., Lukk, T., Kumar, V., Choi, J.Y., Augagneur, Y., Voelker, D.R., Nair, S., and Mamoun, C. Ben (2015). Structure, function and inhibition of the phosphoethanolamine methyltransferases of the human malaria parasites *Plasmodium vivax* and *Plasmodium knowlesi*. *Sci. Rep.* 5, 1–13.
- Garrenton, L.S., Stefan, C.J., McMurray, M.A., Emr, S.D., and Thorner, J. (2010). Pheromone-induced anisotropy in yeast plasma membrane phosphatidylinositol-4,5- bis phosphate distribution is required for MAPK signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 11805–11810.
- Gaubitz, C., Prouteau, M., Kusmider, B., and Loewith, R. (2016). TORC2 structure and function. *Trends Biochem. Sci.* 41, 532–545.
- Gietz, R.D., and Akio, S. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527–534.
- Godfraind, T., Miller, R., and Wibo, M. (1986). Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 38, 321–416.

- Golla, U., Joseph, D., and Tomar, R.S. (2016). Combined transcriptomics and chemical-genetics reveal molecular mode of action of valproic acid , an anticancer molecule using budding yeast model. *Nat. Publ. Gr.* 2016, 1–16.
- González-Rubio, G., Fernández-Acero, T., Martín, H., and Molina, M. (2019). Mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in fungal signaling: Conservation, function, and regulation. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 1709.
- Gordon, A., Colman-Lerner, A., Chin, T.E., Benjamin, K.R., Yu, R.C., and Brent, R. (2007). Single-cell quantification of molecules and rates using open-source microscope-based cytometry. *Nat. Methods* 4, 175–181.
- Gow, N.A.R., Latge, J.-P., and Munro, C.A. (2017). The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *the fungal kingdom* 267–292.
- Gowri, M., Jayashree, B., Jeyakanthan, J., and Girija, E.K. (2020). Sertraline as a promising antifungal agent: Inhibition of growth and biofilm of *Candida auris* with special focus on the mechanism of action *in vitro*. *J. Appl. Microbiol.* 128, 426–437.
- Gray, J., Ogas, J., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D., and Herskowitz, I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* 16, 4924–4937.
- Green, R., Lesage, G., Sdicu, A.M., Ménard, P., and Bussey, H. (2003). A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology* 149, 2487–2499.
- Guo, S., Shen, X., Yan, G., Ma, D., Bai, X., Li, S., and Jiang, Y. (2009). A MAP kinase dependent feedback mechanism controls Rho1 GTPase and actin distribution in yeast. *PLoS One* 4.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1264–1300.
- Haghnazari, E., and Heyer, W.D. (2004). The Hog1 MAP kinase pathway and the Mec1 DNA damage checkpoint pathway independently control the cellular responses to hydrogen peroxide. *DNA Repair (Amst.)* 3, 769–776.
- Hahn, J.S., and Thiele, D.J. (2002). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J. Biol. Chem.* 277, 21278–21284.
- Han, J., Lee, J., Bibbs, L., and Ulevitch, R. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808–811.
- Hao, N., Behar, M., Parnell, S.C., Torres, M.P., Borchers, C.H., Elston, T.C.C., and Dohlman, H.G. (2007). A systems-biology analysis of feedback inhibition in the Sho1 osmotic-stress-response pathway. *Curr. Biol.* 17, 659–667.

- Harrison, J.C., Bardes, E.S.G., Ohya, Y., and Lew, D.J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 3, 417–420.
- Hatakeyama, R., Kono, K., and Yoshida, S. (2017). Ypk1 and Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodeling after membrane stresses. *J. Cell Sci.* 130, 1169–1178.
- Hawle, P., Horst, D., Bebelman, J.P., Yang, X.X., Siderius, M., and Van Der Vies, S.M. (2007). Cdc37p is required for stress-induced high-osmolarity glycerol and protein kinase C mitogen-activated protein kinase pathway functionality by interaction with Hog1p and Slp2p (Mpk1p). *Eukaryot. Cell* 6, 521–532.
- He, X.J., Mulford, K.E., and Fassler, J.S. (2009). Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot. Cell* 8, 768–778.
- Heinisch, J.J. (2005). Baker's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitors - Targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1754, 171–182.
- Heinisch, J.J. (2008). Baker's yeast as a tool for the development of antifungal drugs which target cell integrity - An update. *Expert Opin. Drug Discov.* 3, 931–943.
- Heinisch, J.J., and Rodicio, R. (2018). Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 22–39.
- Heinisch, J.J., Dupres, V., Wilk, S., Jendretzki, A., and Dufrêne, Y.F. (2010a). Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS One* 5.
- Heinisch, J.J., Dupres, V., Alsteens, D., and Dufrene, Y.F. (2010b). Measurement of the mechanical behavior of yeast membrane sensors using single-molecule atomic force microscopy. *Nat. Protoc.* 5, 670–677.
- Hermann, T. (2005). Drugs targeting the ribosome. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 355–366.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 300–372.
- Hohmann, S. (2015). An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* 61, 373–382.
- Hohmann, S., Krantz, M., and Nordlander, B. (2007). Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* 428, 29–45.
- Holbrook, S.Y.L., Garzan, A., Dennis, E.K., Shrestha, S.K., and Garneau-Tsodikova, S. (2017). Repurposing antipsychotic drugs into antifungal agents: Synergistic combinations of azoles and bromperidol derivatives in the treatment of various fungal infections. *Eur. J. Med. Chem.* 139, 12–21.
- Hong, S.Y., Oh, J.E., Mi, Y.K., Choi, M.J., Lee, J.H., Lee, B.L., Moon, H.M., and Lee, K.H. (1998). Identification and characterization of novel antimicrobial decapeptides generated by combinatorial chemistry. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42, 2534–2541.
- Huang, K., Wang, X., Liu, Y., and Zhao, Y. (2015). CRAC channel is inhibited by neomycin in a PtdIns(4,5)P₂-independent manner. *Cell Biochem. Funct.* 33, 97–100.

- Hutzler, F., Gerstl, R., Lommel, M., and Strahl, S. (2008). Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Mol. Microbiol.* 68, 1438–1449.
- Ibarra, A. (2013). Expresión en *S. cerevisiae* de una versión de la MAPK Slt2 capaz de utilizar análogos de ATP. Trabajo fin de Máster. Universidad Complutense.
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M.N., and Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1–mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 8344–8352.
- Ingolia, N.T., and Murray, A.W. (2007). Positive-feedback loops as a flexible biological module. *Curr. Biol.* 17, 668–677.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23–28.
- Inoue, S.B., Qadota, H., Arisawa, M., Watanabe, T., and Ohya, Y. (1999). Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1,3- β -glucan synthase. *J. Biol. Chem.* 274, 38119–38124.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K.S., Levin, D.E., Araki, H., Matsumoto, K., and Oshima, Y. (1993). *MKK1* and *MKK2*, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3076–3083.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163–168.
- Iwatani, W., Arika, T., and Yamaguchi, H. (1993). Two mechanisms of butenafine action in *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37, 785–788.
- Jacoby, J.J., Nilius, S.M., and Heinisch, J.J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Mol. Gen. Genet.* 258, 148–155.
- Jacoby, T., Flanagan, H., Faykin, A., Seto, A.G., Mattison, C., and Ota, I. (1997). Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J. Biol. Chem.* 272, 17749–17755.
- Janschitz, M., Romanov, N., Varnavides, G., Hollenstein, D.M., Gérecová, G., Ammerer, G., Hartl, M., and Reiter, W. (2019). Novel interconnections of HOG signaling revealed by combined use of two proteomic software packages. *Cell Commun. Signal.* 17, 1–17.
- Jarada, T.N., Rokne, J.G., and Alhaji, R. (2020). A review of computational drug repositioning: Strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. *J. Cheminform.* 12, 1–23.
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A., and Heinisch, J.J. (2011). How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur. J. Cell Biol.* 90, 740–744.

- Jiang, L., Cao, C., Zhang, L., Lin, W., Xia, J., Xu, H., and Zhang, Y. (2014). Cadmium-induced activation of high osmolarity glycerol pathway through its Sln1 branch is dependent on the MAP kinase kinase kinase Ssk2, but not its paralog Ssk22, in budding yeast. *FEMS Yeast Res.* *14*, 1263–1272.
- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Sellers-Moya, Á., Molina, M., and Martín, H. (2020a). Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int. Microbiol.* *23*, 107–119.
- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Alonso-Rodríguez, E., Fernández-Acero, T., Molina, M., and Martín, H. (2020b). Rewiring the yeast cell wall integrity (CWI) pathway through a synthetic positive feedback circuit unveils a novel role for the MAPKKK Ssk2 in CWI pathway activation. *FEBS J.* 1–21.
- Jiménez-Sánchez, M., Cid, V.J., and Molina, M. (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* *282*, 31174–31185.
- Jin, G., and Wong, S.T.C. (2014). Toward better drug repositioning: Prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discov. Today* *19*, 637–644.
- Jin, C., Parshin, A. V., Daly, I., Strich, R., and Cooper, K.F. (2013). The cell wall sensors Mtl1, Wsc1, and Mid2 are required for stress-induced nuclear to cytoplasmic translocation of cyclin C and programmed cell death in yeast. *Oxid. Med. Cell. Longev.* *2013*.
- Jin, C., Strich, R., and Cooper, K.F. (2014). Slt2p phosphorylation induces cyclin C nuclear-to-cytoplasmic translocation in response to oxidative stress. *Mol. Biol. Cell* *25*, 1396–1407.
- Jung, U.S., Sobering, A.K., Romeo, M.J., and Levin, D.E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol. Microbiol.* *46*, 781–789.
- Juvvadi, P.R., Lamoth, F., and Steinbach, W.J. (2014). Calcineurin as a multifunctional regulator: Unraveling novel functions in fungal stress responses, hyphal growth, drug resistance, and pathogenesis. *Fungal Biol. Rev.* *28*, 56–69.
- Kamada, Y., Un Sung Jung, Piotrowski, J., and Levin, D.E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* *9*, 1559–1571.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y., and Levin, D.E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rhol GTPase. *J. Biol. Chem.* *271*, 9193–9196.
- Kaneko, Y., Fukazawa, H., Ohno, H., and Miyazaki, Y. (2013). Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. *J. Infect. Chemother.* *19*, 1141–1145.
- Kaster, K.R., Burgett, S.G., and Ingolia, T.D. (1984). Hygromycin B resistance as dominant selectable marker in yeast. *Curr. Genet.* *8*, 353–358.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* Mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* *181*, 3330–3340.

- Kim, K.Y., and Levin, D.E. (2010). Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast* 27, 541–548.
- Kim, K.Y., and Levin, D.E. (2011). Mpk1 MAPK association with the paf1 complex blocks sen1-mediated premature transcription termination. *Cell* 144, 745–756.
- Kim, K.-Y., Cosano, I.C., Levin, D.E., Molina, M., and Martín, H. (2007). Dissecting the transcriptional activation function of the cell wall integrity MAP kinase. *Yeast* 24, 335–342.
- Kim, K.-Y., Truman, A.W., and Levin, D.E. (2008). Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2579–2589.
- Kim, K.-Y., Truman, A.W., Caesar, S., Schlenstedt, G., and Levin, D.E. (2010). Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol. Biol. Cell* 21, 1609–1619.
- Klis, F.M., Boorsma, A., and De Groot, P.W.J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 23, 185–202.
- Kock, C., Dufrêne, Y.F., and Heinisch, J.J. (2015). Up against the wall: Is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 806–811.
- Kock, C., Arlt, H., Ungermann, C., and Heinisch, J.J. (2016). Yeast cell wall integrity sensors form specific plasma membrane microdomains important for signalling. *Cell. Microbiol.* 18, 1251–1267.
- Kono, K., and Ikui, A.E. (2017). A new cell cycle checkpoint that senses plasma membrane/cell wall damage in budding yeast. *BioEssays* 39, 1–7.
- Kono, K., Nogami, S., Abe, M., Nishizawa, M., Morishita, S., Pellman, D., and Ohya, Y. (2008). G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of Rho GEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 19, 1763–1771.
- Kono, K., Al-Zain, A., Schroeder, L., Nakanishi, M., and Ikui, A.E. (2016). Plasma membrane/cell wall perturbation activates a novel cell cycle checkpoint during G1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 6910–6915.
- Krause, S.A., and Gray, J. V. (2002). The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol.* 12, 588–593.
- Krishna, M., and Narang, H. (2008). The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 3525–3544.
- Kulkarny, V. V., Chavez-Dozal, A., Rane, H.S., Jahng, M., Bernardo, S.M., Parra, K.J., and Lee, S.A. (2014). Quinacrine inhibits *Candida albicans* growth and filamentation at neutral pH. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 7501–7509.

- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., and François, J. (2006). Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol. Microbiol.* *61*, 1147–1166.
- Kwon, Y., Chiang, J., Tran, G., Giaever, G., Nislow, C., Hahn, B.S., Kwak, Y.S., and Koo, J.C. (2016). Signaling pathways coordinating the alkaline pH response confer resistance to the hevein-type plant antimicrobial peptide Pn-AMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta* *244*, 1229–1240.
- Laggner, C., Schieferer, C., Fiechtner, B., Poles, G., Hoffmann, R.D., Glossmann, H., Langer, T., and Moebius, F.F. (2005). Discovery of high-affinity ligands of $\sigma 1$ receptor, ERG2, and emopamil binding protein by pharmacophore modeling and virtual screening. *J. Med. Chem.* *48*, 4754–4764.
- Lagorce, A., Hauser, N.C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J.D., and François, J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *278*, 20345–20357.
- Lamers, J.M.J., Cysouw, K.J., and Verdouw, P.D. (1985). Slow calcium channel blockers and calmodulin. Effect of felodipine, nifedipine, prenylamine and bepridil on cardiac sarcolemmal calcium pumping ATPase. *Biochem. Pharmacol.* *34*, 3837–3843.
- Lamson, R.E., Winters, M.J., and Pryciak, P.M. (2002). Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 2939–2951.
- Lass-Flörl, C. (2011). Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: A comparative review. *Drugs* *71*, 2405–2419.
- Laz, E. V., Lee, J., and Levin, D.E. (2020). Crosstalk between *Saccharomyces cerevisiae* SAPKs Hog1 and Mpk1 is mediated by glycerol accumulation. *Fungal Biol.* *124*, 361–367.
- Lee, J., and Levin, D.E. (2018). Intracellular mechanism by which arsenite activates the yeast stress MAPK Hog1. *Mol. Biol. Cell* *29*, 1904–1915.
- Lee, K.S., and Levin, D.E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 172–182.
- Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K., and Levin, D.E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 3067–3075.
- Lee, Y.M., Kim, E., An, J., Lee, Y., Choi, E., Choi, W., Moon, E., and Kim, W. (2017). Dissection of the HOG pathway activated by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Microbiol.* *19*, 584–597.
- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M., Eck, M.J., Mayer, B.J., and Harrison, S.C. (2000). Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* *102*, 387–397.

- Lesage, G., and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 317–343.
- Leskoske, K.L., Roelants, F.M., Martinez Marshall, M.N., Hill, J.M., and Thorner, J. (2017). The stress-sensing TORC2 complex activates yeast AGC-family protein kinase Ypk1 at multiple novel sites. *Genetics* 207, 179–195.
- Leskoske, K.L., Roelants, F.M., Emmerstorfer-Augustin, A., Augustin, C.M., Si, E.P., Hill, J.M., and Thorner, J. (2018). Phosphorylation by the stress-activated MAPK Slt2 down-regulates the yeast TOR complex 2. *Genes Dev.* 32, 1576–1590.
- Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189, 1145–1175.
- Levin, D.E., and Bartlett-Heubusch, E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae* *PKC1* gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* 116, 1221–1229.
- Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M., and Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene, *PKC1*, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62, 213–224.
- Levin, D.E., Bowers, B., Chen, C.Y., Kamada, Y., and Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol. Res.* 40, 229–239.
- Lewis, R.E., and Kontoyiannis, D.P. (2001). Rationale for combination antifungal therapy. *Pharmacotherapy* 21, 149S–164S.
- Li, S., Ault, A., Malone, C.L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L.H., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *EMBO J.* 17, 6952–6962.
- Liao, H.C., and Chen, M.Y. (2012). Target of rapamycin complex 2 signals to downstream effector yeast protein kinase 2 (Ypk2) through adheres-voraciously-to-target-of-rapamycin-2 protein 1 (Avo1) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 287, 6089–6099.
- Liu, L., and Levin, D.E. (2018). Intracellular mechanism by which genotoxic stress activates yeast SAPK Mpk1. *Mol. Biol. Cell* 29, 2898–2909.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408.
- Lockshon, D., Olsen, C.P., Brett, C.L., Chertov, A., Merz, A.J., Lorenz, D.A., Van Gilst, M.R., and Kennedy, B.K. (2012). Rho signaling participates in membrane fluidity homeostasis. *PLoS One* 7, 1–10.
- Lommel, M., Bagnat, M., and Strahl, S. (2004). Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Mol. Cell. Biol.* 24, 46–57.

- Lu, J.M.Y., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransferase Ypd1p shuttles between the nucleus and cytoplasm for SLN1-dependent phosphorylation of Ssk1p and Skn7p. *Eukaryot. Cell* 2, 1304–1314.
- Lu, Y., Zhou, Z., Mo, L., Guo, Q., Peng, X., Hu, T., Zhou, X., Ren, B., and Xu, X. (2019). Fluphenazine antagonizes with fluconazole but synergizes with amphotericin B in the treatment of candidiasis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 6701–6709.
- MacCallum, D.M., Desbois, A.P., and Coote, P.J. (2013). Enhanced efficacy of synergistic combinations of antimicrobial peptides with caspofungin versus *Candida albicans* in insect and murine models of systemic infection. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 1055–1062.
- Macia, J., Regot, S., Peeters, T., Conde, N., Solé, R., and Posas, F. (2009). Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Sci. Signal.* 2, 1–10.
- Madden, K., Sheu, Y.J., Baetz, K., Andrews, B., and Snyder, M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* 275, 1781–1784.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S.M., and Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369, 242–245.
- Maeda, T., Takekawa, M., and Saito, H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269, 554–558.
- Mager, W.H., and Winderickx, J. (2005). Yeast as a model for medical and medicinal research. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 265–273.
- Mamouei, Z., Alqarihi, A., Singh, S., Xu, S., Mansour, M.K., Ibrahim, A.S., and Uppuluri, P. (2018). Alexidine dihydrochloride has broad-spectrum activities against diverse fungal pathogens. *MSphere* 3, 1–11.
- Manfiolli, A.O., Mattos, E.C., De Assis, L.J., Silva, L.P., Ulas, M., Brown, N.A., Silva-Rocha, R., Bayram, Ö., and Goldman, G.H. (2019). *Aspergillus fumigatus* high osmolarity glycerol mitogen activated protein kinases saka and mpkc physically interact during osmotic and cell wall stresses. *Front. Microbiol.* 10.
- Manning, B.D., Padmanabha, R., and Snyder, M. (1997). The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 8, 1829–1844.
- Mapes, J., and Ota, I.M. (2004). Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *EMBO J.* 23, 302–311.
- Marín, M.J., Flández, M., Bermejo, C., Arroyo, J., Martín, H., and Molina, M. (2009). Different modulation of the outputs of yeast MAPK-mediated pathways by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5. *Mol. Genet. Genomics* 281, 345–359.

- Martín, H., Alonso-Rodríguez, E., Nombela, C., and Molina, M. (2015). Construcción génica y métodos para detectar compuestos antifúngicos y antitumorales. N° de solicitud de la patente: 201400935. País de prioridad: España. Fecha de prioridad: 01/09/2015. N° de publicación de la patente: ES2530292B2.
- Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M., and Nombela, C. (1993). Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37° C. *MGG Mol. Gen. Genet.* *241*, 177–184.
- Martín, H., Shales, M., Fernandez-Piñar, P., Wei, P., Molina, M., Fiedler, D., Shokat, K.M., Beltrao, P., Lim, W., and Krogan, N.J. (2015). Differential genetic interactions of yeast stress response MAPK pathways. *Mol. Syst. Biol.* *11*, 800.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 1511–1519.
- Martín, H., Flández, M., Nombela, C., and Molina, M. (2005). Protein phosphatases in MAPK signalling: We keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.* *58*, 6–16.
- Martínez-Soto, D., and Ruiz-Herrera, J. (2017). Functional analysis of the MAPK pathways in fungi. *Rev. Iberoam. Micol.* *34*, 192–202.
- Mascaraque, V., Hernaez, M.L., Jimenez-Sanchez, M., Hansen, R., Gil, C., Martín, H., Cid, V.J., and Molina, M. (2013). Phosphoproteomic analysis of protein kinase c signaling in *Saccharomyces cerevisiae* reveals Slt2 mitogen-activated protein kinase (mapk)-dependent phosphorylation of eisosome core components. *Mol. Cell. Proteomics* *12*, 557–574.
- Masuda, T., Tanaka, K., Nonaka, H., Yamochi, W., Maeda, A., and Takai, Y. (1994). Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. *J. Biol. Chem.* *269*, 19713–19718.
- Matia-González, A.M., and Rodríguez-Gabriel, M.A. (2011). Slt2 MAPK pathway is essential for cell integrity in the presence of arsenate. *Yeast* *28*, 9–17.
- Mattison, C.P., and Ota, I.M. (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev.* *14*, 1229–1235.
- Mattison, C.P., Spencer, S.S., Kresge, K.A., Lee, J., and Ota, I.M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7651–7660.
- Mellor, H., and Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* *332*, 281–292.
- Mensonides, F.I.C., Brul, S., Klis, F.M., Hellingwerf, K.J., and De Mattos, M.J.T. (2005). Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 4531–4538.

- Millson, S.H., Truman, A.W., King, V., Prodromou, C., Pearl, L.H., and Piper, P.W. (2005). A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slt2p (Mpk1p). *Eukaryot. Cell* 4, 849–860.
- Mingeot-Leclercq, M.P., Gallet, X., Flore, C., Van Bambeke, F., Peuvot, J., and Brasseur, R. (2001). Experimental and conformational analyses of interactions between butenafine and lipids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 3347–3354.
- Mishra, R., Van Drogen, F., Dechant, R., Oh, S., Jeon, N.L., Lee, S.S., Peter, M., and Weitz, D.A. (2017). Protein kinase C and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114, 13471–13476.
- Missiaen, L., Wuytack, F., Raeymaekers, L., De Smedt, H., and Casteels, R. (1989). Polyamines and neomycin inhibit the purified plasma-membrane Ca^{2+} pump by interacting with associated polyphosphoinositides. *Biochem. J.* 261, 1055–1058.
- Mitchell, D.A., Marshall, T.K., and Deschenes, R.J. (1993). Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* 9, 715–722.
- Mitrophanov, A.Y., and Groisman, E.A. (2008). Positive feedback in cellular control systems. *BioEssays* 30, 542–555.
- Mizuno, T., Nakamura, M., and Irie, K. (2018). Induction of Ptp2 and Cmp2 protein phosphatases is crucial for the adaptive response to ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci. Rep.* 8, 1–12.
- Moebius, F.F., Bermoser, K., Reiter, R.J., Hanner, M., and Glossmann, H. (1996). Yeast sterol C8-C7 isomerase: Identification and characterization of a high-affinity binding site for enzyme inhibitors. *Biochemistry* 35, 16871–16878.
- Molbaek, K., Scharff-Poulsen, P., Helix-Nielsen, C., Klaerke, D.A., and Pedersen, A.A. (2015). High yield purification of full-length functional hERG K^{+} channels produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 14, 1–16.
- Mollapour, M., and Piper, P.W. (2006). Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 6, 1274–1280.
- Mollapour, M., Shepherd, A., and Piper, P.W. (2009). Presence of the Fps1p aquaglyceroporin channel is essential for Hog1p activation, but suppresses Slt2(Mpk1)p activation, with acetic acid stress of yeast. *Microbiology* 155, 3304–3311.
- Momtazi-Borojeni, A.A., Abdollahi, E., Ghasemi, F., Caraglia, M., and Sahebkar, A. (2018). The novel role of pyrvinium in cancer therapy. *J Cell Physiol.* 233, 2871–2881.
- Montoya, M.C., Didone, L., Heier, R.F., Meyers, M.J., and Krysan, D.J. (2018). Antifungal phenothiazines: Optimization, characterization of mechanism, and modulation of neuroreceptor activity. *ACS Infect. Dis.* 4, 499–507.

- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., and De Virgilio, C. (2015). TORC1 controls G 1 -S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat. Commun.* 6, 1–10.
- Mukherjee, P.K., Sheehan, D.J., Hitchcock, C.A., and Ghannoum, M.A. (2005). Combination treatment of invasive fungal infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 163–194.
- Mulet, J.M., Martin, D.E., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling. *J. Biol. Chem.* 281, 33000–33007.
- Murakami, Y., Tatebayashi, K., and Saito, H. (2008). Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* 28, 2481–2494.
- de Nadal, E., Alepuz, P.M., and Posas, F. (2002). Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep.* 3, 735–740.
- De Nadal, E., and Posas, F. (2015). Osmostress-induced gene expression - A model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription. *FEBS J.* 282, 3275–3285.
- Nagiec, M.J., and Dohlman, H.G. (2012). Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS Genet.* 8.
- Nasution, O., Lee, Y.M., Kim, E., Lee, Y., Kim, W., and Choi, W. (2017). Overexpression of *OLE1* enhances stress tolerance and constitutively activates the MAPK HOG pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 114, 620–631.
- Newton, A.C. (1995). Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495–28498.
- Nguyen, T.H., Fleet, G.H., and Rogers, P.L. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 206–212.
- Nicholls, M.W. (1970). Polymyxin sensitivity of *Candida tropicalis*. *J. Med. Microbiol.* 3, 529–538.
- Nielsen, J. (2019). Yeast systems biology: Model organism and cell factory. *Biotechnol. J.* 14, 1–9.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Paulais, M., Teulon, J., and Sepúlveda, F. V. (2017). Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate dynamically regulates the K2P background K⁺ channel TASK-2. *Sci. Rep.* 7, 1–14.
- Niles, B.J., and Powers, T. (2014). TOR complex 2–Ypk1 signaling regulates actin polarization via reactive oxygen species. *Mol. Biol. Cell* 25, 3962–3972.
- Niles, B.J., Mogri, H., Hill, A., Vlahakis, A., and Powers, T. (2012). Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 1536–1541.

- Nishimura, A., Yamamoto, K., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Saito, H., and Tatebayashi, K. (2016). Scaffold protein Ahk1, which associates with Hkr1, Sho1, Ste11, and Pbs2, inhibits crosstalk signaling from the Hkr1 osmosensor to the Kss1 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* 36, 1109–1123.
- de Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., and Klis, F.M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in *FKS2-lacZ* expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* 146, 2121–2132.
- Nomura, W., and Inoue, Y. (2015). Methylglyoxal activates the Target of Rapamycin Complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 35, 1269–1280.
- Nomura, W., Ito, Y., and Inoue, Y. (2017). Role of phosphatidylserine in the activation of Rho1-related Pkc1 signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Signal.* 31, 146–153.
- Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y. (1995). A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 14, 5931–5938.
- Nosengo, N. (2016). Can you teach old drugs new tricks? *Nature* 534, 314–316.
- Nunez, L.R., Jesch, S.A., Gaspar, M.L., Almaguer, C., Villa-Garcia, M., Ruiz-Noriega, M., Patton-Vogt, J., and Henry, S.A. (2008). Cell wall integrity MAPK pathway is essential for lipid homeostasis. *J. Biol. Chem.* 283, 34204–34217.
- O'Rourke, S.M., and Herskowitz, I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 12, 2874–2886.
- O'Rourke, S.M., and Herskowitz, I. (2004). Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol. Biol. Cell* 15, 532–542.
- De Oliveira, H.C., Monteiro, M.C., Rossi, S.A., Pemán, J., Ruiz-Gaitán, A., Mendes-Giannini, M.J.S., Mellado, E., and Zaragoza, O. (2019). Identification of off-patent compounds that present antifungal activity against the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 1–10.
- Ono, T., Suzuki, T., Anraku, Y., and Iida, H. (1994). The *MID2* gene encodes a putative integral membrane protein with a Ca²⁺-binding domain and shows mating pheromone-stimulated expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 151, 203–208.
- Orlean, P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics* 192, 775–818.
- Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: Cell wall structure and formation. *Micron* 29, 207–233.
- Ota, I.M., and Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science* 262, 566–569.

- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., and Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *15*, 2196–2207.
- Parapouli, M., Vasileiadi, A., Afendra, A.-S., and Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiol.* *6*, 1–32.
- Paravicini, G., Cooper, M., Friedli, L., Smith, D.J., Carpentier, J.L., Klig, L.S., and Payton, M.A. (1992). The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional *PKC1* gene product. *Mol. Cell. Biol.* *12*, 4896–4905.
- Patil, A., and Majumdar, S. (2017). Echinocandins in antifungal pharmacotherapy. *J. Pharm. Pharmacol.* *69*, 1635–1660.
- Pérez-Fernández, D., Shcherbakov, D., Matt, T., Leong, N.C., Kudyba, I., Duscha, S., Boukari, H., Patak, R., Dubbaka, S.R., Lang, K., et al. (2014). 4'-O-substitutions determine selectivity of aminoglycoside antibiotics. *Nat. Commun.* *5*, 3112.
- Perez, A.M., and Thorner, J. (2019). Septin-associated proteins Aim44 and Nis1 traffic between the bud neck and the nucleus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytoskeleton* *76*, 15–32.
- Perez, P., and Rincón, S.A. (2010). Rho GTPases: Regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J.* *426*, 243–253.
- Petkova, M.I., Pujol-Carrion, N., Arroyo, J., García-Cantalejo, J., and De La Torre-Ruiz, M.A. (2010). Mtl1 is required to activate general stress response through TOR1 and RAS2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* *285*, 19521–19531.
- Petkova, M.I., Pujol-Carrion, N., and de la Torre-Ruiz, M.A. (2012). Mtl1 O-mannosylation mediated by both Pmt1 and Pmt2 is important for cell survival under oxidative conditions and TOR blockade. *Fungal Genet. Biol.* *49*, 903–914.
- Philip, B., and Levin, D.E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 271–280.
- Piao, H.L., Machado, I.M.P., and Payne, G.S. (2007). NPFXD-mediated endocytosis is required for polarity and function of a yeast cell wall stress sensor. *Mol. Biol. Cell* *18*, 57–65.
- Piña, F., Yagisawa, F., Obara, K., Gregerson, J.D., Kihara, A., and Niwa, M. (2018). Sphingolipids activate the endoplasmic reticulum stress surveillance pathway. *J. Cell Biol.* *217*, 495–505.
- Posas, F., and Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* *276*, 1702–1705.
- Posas, F., and Saito, H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.* *17*, 1385–1394.

- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* 86, 865–875.
- Posas, F., Witten, E.A., and Saito, H. (1998). Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the High-Osmolarity Glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.* 18, 5788–5796.
- Posas, F., Chamber, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., De Nadal, E., and Ariño, J. (2000). The transcriptional response of yeast to saline stress. *J. Biol. Chem.* 275, 17249–17255.
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P.A., Escott, K.J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., et al. (2018). Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 41–58.
- Qadota, H., Anraku, Y., Botstein, D., and Ohya, Y. (1994). Conditional lethality of a yeast strain expressing human RHOA in place of RHO1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 9317–9321.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., and Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- β -glucan synthase. *Science* 272, 279–281.
- Qian, Y., and Guan, M.X. (2009). Interaction of aminoglycosides with human mitochondrial 12S rRNA carrying the deafness-associated mutation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 4612–4618.
- Queralt, E., and Igual, J.C. (2005). Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171, 1485–1498.
- Rabelo, V.W.H., Viegas, D. de J., Tucci, E.M.N., Romeiro, N.C., and Abreu, P.A. (2019). Virtual screening and drug repositioning as strategies for the discovery of new antifungal inhibitors of oxidosqualene cyclase. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 185, 189–199.
- Raitt, D.C., Posas, F., and Saito, H. (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J.* 19, 4623–4631.
- Rajasekharan, S.K., Lee, J.H., and Lee, J. (2019). Aripiprazole repurposed as an inhibitor of biofilm formation and sterol biosynthesis in multidrug-resistant *Candida albicans*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 54, 518–523.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B., and Levin, D.E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3969–3976.
- Ram, A.F.J., Brekelmans, S.S.C., Oehlen, L.J.W.M., and Klis, F.M. (1995). Identification of two cell cycle regulated genes affecting the β (1,3)-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 358, 165–170.
- Ray, A., Hector, R.E., Roy, N., Song, J.H., Berkner, K.L., and Runge, K.W. (2003). Sir3p phosphorylation by the Slt2p pathway effects redistribution of silencing function and shortened lifespan. *Nat. Genet.* 33, 522–526.

- Reiser, V., Ruis, H., and Ammerer, G. (1999). Kinase activity-dependent nuclear export opposes stress-induced nuclear accumulation and retention of Hog1 mitogen-activated protein kinase in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10, 1147–1161.
- Reiser, V., Salah, S.M., and Ammerer, G. (2000). Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmostress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat. Cell Biol.* 2, 620–627.
- Reiser, V., Raitt, D.C., and Saito, H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.* 161, 1035–1040.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., and Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *J. Biol. Chem.* 275, 8290–8300.
- Rodicio, R., and Heinisch, J.J. (2010). Together we are strong-cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast* 27, 531–540.
- Rodríguez-Peña, J.M., García, R., Nombela, C., and Arroyo, J. (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: A yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* 27, 495–502.
- Rodríguez-Peña, J.M., Díez-Muñiz, S., Bermejo, C., Nombela, C., and Arroyo, J. (2013). Activation of the yeast cell wall integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2. *FEBS Lett.* 587, 3675–3680.
- Roelants, F., Leskoske, K., Martinez Marshall, M.N., Locke, M., and Thorner, J. (2017). The TORC2-dependent signaling network in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomolecules* 7, 66.
- Roelants, F.M., Torrance, P.D., Bezman, N., and Thorner, J. (2002). Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Mol. Biol. Cell* 13, 3005–3028.
- Roelants, F.M., Torrance, P.D., and Thorner, J. (2004). Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology* 150, 3289–3304.
- Roemer, T., and Bussey, H. (1991). Yeast β -glucan synthesis: *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis *in vivo* and for glucan synthase activity *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 11295–11299.
- Roemer, T., and Krysan, D.J. (2014). Unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harb Perspect Med* 4, a019703.
- Romanov, N., Hollenstein, D.M., Janschitz, M., Ammerer, G., Anrather, D., and Reiter, W. (2017). Identifying protein kinase-specific effectors of the osmostress response in yeast. *Sci. Signal.* 10, eaag2435.
- Rossi, S.A., De Oliveira, H.C., Agreda-Mellon, D., Lucio, J., Soares Mendes-Giannini, M.J., García-Camero, J.P., and Zaragoza, O. (2020). Identification of off-patent drugs that show synergism with amphotericin B or

that present antifungal action against *Cryptococcus neoformans* and *Candida* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, 1–16.

Rousseau, A., and Bertolotti, A. (2016). An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature* **536**, 184–189.

Saito, H. (2001). Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chem. Rev.* **101**, 2497–2509.

Saito, H., and Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **192**, 289–318.

Saito, H., and Tatebayashi, K. (2004). Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem.* **136**, 267–272.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2006). The inoue method for preparation and transformation of competent *E. coli*: “Ultra-competent” cells. *CSH Protoc.* **2006**.

Sanglard, D., Ischer, F., Marchetti, O., Entenza, J., and Bille, J. (2003). Calcineurin A of *Candida albicans*: Involvement in antifungal tolerance, cell morphogenesis and virulence. *Mol. Microbiol.* **48**, 959–976.

Santiago-Cartagena, E., González-Crespo, S., Vélez, V., Martínez, N., Snider, J., Jessulat, M., Aoki, H., Minic, Z., Akamine, P., Mejías, I., et al. (2019). Identification and functional testing of novel interacting protein partners for the stress sensors Wsc1p and Mid2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 Genes, Genomes, Genet.* **9**, 1085–1102.

Santos, S.D.M., Verveer, P.J., and Bastiaens, P.I.H. (2007). Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. *Nat. Cell Biol.* **9**, 324–330.

Sanz, A., García, R., Rodríguez-Peña, J., and Arroyo, J. (2017). The CWI pathway: Regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast. *J. Fungi* **4**, 1.

Sanz, A.B., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Díez-Muñiz, S., Nombela, C., Peterson, C.L., and Arroyo, J. (2012). Chromatin remodeling by the SWI/SNF complex is essential for transcription mediated by the yeast cell wall integrity MAPK pathway. *Mol. Biol. Cell* **23**, 2805–2817.

Sanz, A.B., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., and Arroyo, J. (2016). Cooperation between SAGA and SWI/SNF complexes is required for efficient transcriptional responses regulated by the yeast MAPK Slt2. *Nucleic Acids Res.* **44**, 7159–7172.

- Sanz, A.B., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., and Arroyo, J. (2018). Slt2 MAPK association with chromatin is required for transcriptional activation of Rlm1 dependent genes upon cell wall stress. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* 1861, 1029–1039.
- Schacht, J. (1976). Inhibition by neomycin of polyphosphoinositide turnover in subcellular fractions of Guinea-pig cerebral cortex *in vitro*. *J. Neurochem.* 27, 1119–1124.
- Schmelzle, T., Helliwell, S.B., and Hall, M.N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1329–1339.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., and Hall, M.N. (1997). Homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531–542.
- Schmidt, A., Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 45, 1433–1441.
- Schmitz, H., Lorberg, A., and Heinisch, J.J. (2002). Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol. Microbiol.* 44, 829–840.
- Schneider-Poetsch, T., Ju, J., Eyler, D.E., Dang, Y., Bhat, S., Merrick, W.C., Green, R., Shen, B., and Liu, J.O. (2010). Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat. Chem. Biol.* 6, 209–217.
- Schuldiner, M., Collins, S.R., Thompson, N.J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J.F., et al. (2005). Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123, 507–519.
- Sedgwick, S.G., Taylor, I.A., Adam, A.C., Spanos, A., Howell, S., Morgan, B.A., Treiber, M.K., Kanuga, N., Banks, G.R., Foord, R., et al. (1998). Structural and functional architecture of the yeast cell-cycle transcription factor Swi6. *J. Mol. Biol.* 281, 763–775.
- Seo, J.B., Jung, S.R., Huang, W., Zhang, Q., and Koh, D.S. (2015). Charge shielding of PIP₂ by cations regulates enzyme activity of phospholipase C. *PLoS One* 10, 1–22.
- Serrano, R., Martín, H., Casamayor, A., and Ariño, J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 39785–39795.
- Shankarnarayan, S., Narang, S.S., Malone, C.L., Deschenes, R.J., and Fassler, J.S. (2008). Modulation of yeast Sln1 kinase activity by the CCW12 cell wall protein. *J. Biol. Chem.* 283, 1962–1973.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J.B. (1986) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sheu, Y.-J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., and Snyder, M. (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4053–4069.

- Shih, J.L., Reck-Peterson, S.L., Newitt, R., Mooseker, M.S., Aebersold, R., and Herskowitz, I. (2005). Cell polarity protein Spa2P associates with proteins involved in actin function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 16, 4595–4608.
- Sidorova, J.M., Mikesell, G.E., and Breeden, L.L. (1995). Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Mol. Biol. Cell* 6, 1641–1658.
- Sirisattha, S., Momose, Y., Kitagawa, E., and Iwahashi, H. (2004). Toxicity of anionic detergents determined by *Saccharomyces cerevisiae* microarray analysis. *Water Res.* 38, 61–70.
- Smits, G.J., Kapteyn, J.C., Ende, H. Van Den, and Klis, F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 348–352.
- Soler, M., Plovins, A., Martin, H., Molina, M., and Nombela, C. (1995). Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and *in vivo* interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol. Microbiol.* 17, 833–842.
- Soriano-Carot, M., Bano, M.C., and Igual, J.C. (2012). The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div.* 7, 1.
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenö, P., and Hall, M.N. (2010). The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol. Biol. Cell* 21, 3475–3486.
- Spira, F., Mueller, N.S., Beck, G., Von Olshausen, P., Beig, J., and Wedlich-Söldner, R. (2012). Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat. Cell Biol.* 14, 640–648.
- Staleva, L., Hall, A., and Orlow, S.J. (2004). Oxidative stress activates *FUS1* and *RLM1* transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent manner. *Mol. Biol. Cell* 15, 5574–5582.
- Straede, A., and Heinisch, J.J. (2007). Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS Lett.* 581, 4495–4500.
- Straede, A., Corran, A., Bundy, J., and Heinisch, J.J. (2007). The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. *Yeast* 24, 321–334.
- Streuli, C.H., and Akhtar, N. (2009). Signal co-operation between integrins and other receptor systems. *Biochem. J.* 418, 491–506.
- Sukegawa, Y., Negishi, T., Kikuchi, Y., Ishii, K., Imanari, M., Ghanegolmohammadi, F., Nogami, S., and Ohya, Y. (2018). Genetic dissection of the signaling pathway required for the cell wall integrity checkpoint. *J. Cell Sci.* 131.
- Sun, Y., Gao, L., Yuan, M., Yuan, L., Yang, J., and Zeng, T. (2020). *In vitro* and *in vivo* study of antifungal effect of pyrvinium pamoate alone and in combination with azoles against *Exophiala dermatitidis*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–12.

- Tabuchi, M., Audhya, A., Parsons, A.B., Boone, C., and Emr, S.D. (2006). The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 5861–5875.
- Tada, R., Latgé, J.-P., and Aimagani, V. (2013). Undressing the fungal cell wall/cell membrane- the antifungal drug targets. *Curr. Pharm. Des.* 19, 3738–3747.
- Tajima, N., Karakas, E., Grant, T., Simorowski, N., Diaz-Avalos, R., Grigorieff, N., and Furukawa, H. (2016). Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature* 534, 63–68.
- Takaku, T., Ogura, K., Kumeta, H., Yoshida, N., and Inagaki, F. (2010). Solution structure of a novel Cdc42 binding module of Bem1 and its interaction with Ste20 and Cdc42. *J. Biol. Chem.* 285, 19346–19353.
- Tanaka, K., Tatebayashi, K., Nishimura, A., Yamamoto, K., Yang, H.Y., and Saito, H. (2014). Yeast osmosensors Hkr1 and Msb2 activate the Hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Sci. Signal.* 7, 1–10.
- Tatebayashi, K., Takekawa, M., and Saito, H. (2003). A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J.* 22, 3624–3634.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tanaka, K., Tomida, T., Maruoka, T., Kasukawa, E., and Saito, H. (2006). Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.* 25, 3033–3044.
- Tatebayashi, K., Yang, H., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., and Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J.* 26, 3521–3533.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Nagoya, M., Takayama, T., Nishimura, A., Sakurai, M., Momma, T., and Saito, H. (2015). Osmosensing and scaffolding functions of the oligomeric four-transmembrane domain osmosensor Sho1. *Nat. Commun.* 6, 4–6.
- Tatebayashi, K., Yamamoto, K., Tomida, T., Nishimura, A., Takayama, T., Oyama, M., Kozuka-Hata, H., Adachi-Akahane, S., Tokunaga, Y., and Saito, H. (2020). Osmostress enhances activating phosphorylation of Hog1 MAP kinase by mono-phosphorylated Pbs2 MAP2K. *EMBO J.* 39.
- Tatjer, L., Sacristán-Reviriego, A., Casado, C., González, A., Rodríguez-Porrata, B., Palacios, L., Canadell, D., Serra-Cardona, A., Martín, H., Molina, M., et al. (2016). Wide-ranging effects of the yeast Ptc1 protein phosphatase acting through the MAPK kinase Mkk1. *Genetics* 202, 141–156.
- Taylor, I.A., McIntosh, P.B., Pala, P., Treiber, M.K., Howell, S., Lane, A.N., and Smerdon, S.J. (2000). Characterization of the DNA-binding domains from the yeast cell cycle transcription factors Mbp1 and Swi4. *Biochemistry* 39, 3943–3954.
- Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H., and Ammerer, G. (2001). Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 5625–5630.

Thangamani, S., Maland, M., Mohammad, H., Pascuzzi, P.E., Avramova, L., Koehler, C.M., Hazbun, T.R., and Seleem, M.N. (2017). Repurposing approach identifies auranofin with broad spectrum antifungal activity that targets Mia40-erv1 pathway. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 1–13.

Thévenod, F., and Lee, W.K. (2013). Cadmium and cellular signaling cascades: Interactions between cell death and survival pathways. *Arch Toxicol.* 87, 1743–86.

Torres, J., Di Como, C.J., Herrero, E., and De La Torre-Ruiz, M.A. (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 43495–43504.

Treviño-Rangel, R.D.J., Villanueva-Lozano, H., Hernández-Rodríguez, P., Martínez-Reséndez, M.F., García-Juárez, J., Rodríguez-Rocha, H., and González, G.M. (2016). Activity of sertraline against *Cryptococcus neoformans*: *In vitro* and *in vivo* assays. *Med. Mycol.* 54, 280–286.

Trimble, M.J., Mlynářčik, P., Kolář, M., and Hancock, R.E.W. (2016). Polymyxin: Alternative mechanisms of action and resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, 1–22.

Tripathi, S.K., Feng, Q., Liu, L., Levin, D.E., Roy, K.K., Doerksen, R.J., Baerson, S.R., Shi, X., Pan, X., Xu, W., et al. (2020). Puupehenone, a marine-sponge-derived sesquiterpene quinone, potentiates the antifungal drug caspofungin by disrupting Hsp90 activity and the cell wall integrity pathway. *MSphere* 5, 1–20.

Truckses, D.M., Bloomekatz, J.E., and Thorner, J. (2006). The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 912–928.

Truman, A.W., Kim, K.-Y., and Levin, D.E. (2009). Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 29, 6449–6461.

Udom, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., and Auesukaree, C. (2019). Coordination of the cell wall integrity and highosmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 85.

Uesono, Y., Araki, T., and Toh-E, A. (2008). Local anesthetics, antipsychotic phenothiazines, and cationic surfactants shut down intracellular reactions through membrane perturbation in yeast. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 2884–2894.

Uesono, Y., Toh-e, A., Kikuchi, Y., and Terashima, I. (2011). Structural analysis of compounds with actions similar to local anesthetics and antipsychotic phenothiazines in yeast. *Yeast* 28, 391–404.

Vázquez-Ibarra, A., Rodríguez-Martínez, G., Guerrero-Serrano, G., Kawasaki, L., Ongay-Larios, L., and Coria, R. (2020). Negative feedback-loop mechanisms regulating HOG- and pheromone-MAPK signaling in yeast. *Curr. Genet.* 66, 867–880.

Vázquez-Ibarra, A., Subirana, L., Ongay-Larios, L., Kawasaki, L., Rojas-Ortega, E., Rodríguez-González, M., Nadal, E., Posas, F., and Coria, R. (2018). Activation of the Hog1 MAPK by the Ssk2/Ssk22 MAP 3Ks, in the

absence of the osmosensors, is not sufficient to trigger osmostress adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS J. 285, 1079–1096.

Vélez-Segarra, V., Carrasquillo-Carrión, K., Santini-González, J.J., Ramos-Valerio, Y.A., Vázquez-Quñones, L.E., Roche-Lima, A., Rodríguez-Medina, J.R., and Parés-Matos, E.I. (2019). Modelling and molecular docking studies of the cytoplasmic domain of Wsc-family, full-length Ras2p, and therapeutic antifungal compounds. Comput. Biol. Chem. 78, 338–352.

Vermes, A., Guchelaar, H.J., and Dankert, J. (2000). Flucytosine: A review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. J. Antimicrob. Chemother. 46, 171–179.

Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 94, 13804–13809.

Vilaça, R., Mendes, V., Mendes, M.V., Carreto, L., Amorim, M.A., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Mateus, N., and Costa, V. (2012). Quercetin protects *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative stress by inducing trehalose biosynthesis and the cell wall integrity pathway. PLoS One 7, 1–11.

Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., and De La Torre-Ruiz, M.A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. J. Biol. Chem. 280, 9149–9159.

Voogd, C.E., van der Stel, J.J., and Jacobs, J.J.J.A.A. (1980). The mutagenic action of quindoxin, carbadox, olaquinox and some other N-oxides on bacteria and yeast. Mutat. Res. Toxicol. 78, 233–242.

Vu, K., and Gelli, A. (2010). Astemizole and an analogue promote fungicidal activity of fluconazole against *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii*. Med. Mycol. 48, 255–262.

Walker, L.A., Gow, N.A.R., and Munro, C.A. (2010). Fungal echinocandin resistance. Fungal Genet. Biol. 47, 117–126.

Walther, T.C., Aguilar, P.S., Fröhlich, F., Chu, F., Moreira, K., Burlingame, A.L., and Walter, P. (2007). Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. EMBO J. 26, 4946–4955.

Wang, B.M., Weiner, N.D., Ganesan, M.G., and Schacht, J. (1984). Interaction of calcium and neomycin with anionic phospholipid-lecithin liposomes. A differential scanning calorimetry study. Biochem. Pharmacol. 33, 3787–3791.

Wang, Y., Zhu, M., Ayalew, M., and Ruff, J.A. (2008). Down-regulation of Pkc1-mediated signaling by the deubiquitinating enzyme Ubp3. J. Biol. Chem. 283, 1954–1961.

Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D., and Ota, I. (2001). Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. Mol. Cell. Biol. 21, 51–60.

- Watanabe, D., Abe, M., and Ohya, Y. (2001). Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1, 3- β -glucan synthesis. *Yeast* 18, 943–951.
- Watanabe, Y., Irie, K., and Matsumoto, K. (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5740–5749.
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., and Matsumoto, K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2615–2623.
- Westfall, P.J., and Thorner, J. (2006). Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress : Use of an analog-sensitive *HOG1* allele. *Eukaryot. Cell* 5, 1215–1228.
- Westfall, P.J., Patterson, J.C., Chen, R.E., and Thorner, J. (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 12212–12217.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B., and Johnson, G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol. Rev.* 79, 143–180.
- Wiederhold, N.P. (2018). The antifungal arsenal: Alternative drugs and future targets. *Int. J. Antimicrob. Agents* 51, 333–339.
- Wilk, S., Wittland, J., Thywissen, A., Schmitz, H.P., and Heinisch, J.J. (2010). A block of endocytosis of the yeast cell wall integrity sensors Wsc1 and Wsc2 results in reduced fitness *in vivo*. *Mol. Genet. Genomics* 284, 217–229.
- Wood, J.M. (2011). Bacterial osmoregulation: A paradigm for the study of cellular homeostasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 65, 215–238.
- Wu, C., Leberer, E., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (1999). Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10, 2425–2440.
- Wu, C., Jansen, G., Zhang, J., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2006). Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev.* 20, 734–746.
- Wu, Y., He, Z., Li, S., Tang, H., Wang, L., Yang, S., Dong, B., Qin, J., Sun, Y., Yu, H., et al. (2019). Gefitinib represses JAK-STAT signaling activated by CRTC1-MAML2 fusion in mucoepidermoid carcinoma cells. *Curr. Cancer Drug Targets* 19, 796–806.
- Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., and Saito, H. (1997). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell. Biol.* 17, 1289–1297.
- Xiong, B., Zhang, L., Xu, H., Yang, Y., and Jiang, L. (2015). Cadmium induces the activation of cell wall integrity pathway in budding yeast. *Chem. Biol. Interact.* 240, 316–323.

- Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T., and Takai, Y. (1994). Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 125, 1077–1093.
- Yang, H., Tatebayashi, K., Yamamoto, K., and Saito, H. (2009). Glycosylation defects activate filamentous growth. *EMBO J.* 28, 1380–1391.
- Yoshida, S., Kono, K., Lowery, D.M., Bartolini, S., Yaffe, M.B., Ohya, Y., and Pellman, D. (2006). Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* 313, 108–111.
- Yoshida, S., Bartolini, S., and Pellman, D. (2009). Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev.* 23, 810–823.
- Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al-Zarban, S., and Ota, I. (2002). Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryot. Cell* 1, 1032–1040.
- Yousfi, H., Ranque, S., Rolain, J.M., and Bittar, F. (2019). *In vitro* polymyxin activity against clinical multidrug-resistant fungi. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 8, 1–10.
- Yu, J.W., Mendrola, J.M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D.B., Murray, D., Emr, S.D., and Lemmon, M.A. (2004). Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol. Cell* 13, 677–688.
- Yurko, N., Liu, X., Yamazaki, T., Hoque, M., Tian, B., and Manley, J.L. (2017). MPK1/SLT2 links multiple stress responses with gene expression in budding yeast by phosphorylating Tyr1 of the RNAP II CTD. *Mol. Cell* 68, 913–925.e3.
- Yuzyuk, T., and Amberg, D.C. (2003). Actin recovery and bud emergence in osmotically stressed cells requires the conserved actin interacting mitogen-activated protein kinase kinase kinase Ssk2p/MTK1 and the scaffold protein Spa2p. *Mol. Biol. Cell* 14, 3013–3026.
- Yuzyuk, T., Foehr, M., and Amberg, D.C. (2002). The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. *Mol. Biol. Cell* 13, 2869–2880.
- Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., Nittler, M.P., and Lim, W.A. (2004). Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Mol. Cell* 14, 825–832.
- Zeidler, U., Bougnoux, M.E., Lupan, A., Helynck, O., Doyen, A., Garcia, Z., Sertour, N., Clavaud, C., Munier-Lehmann, H., Saveanu, C., et al. (2013). Synergy of the antibiotic colistin with echinocandin antifungals in *Candida* species. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1285–1296.
- Zeng, B., Li, J., Wang, Y., Chen, P., Wang, X., Cui, J., Liu, L., Hu, X., Cao, Q., Xiao, Y., et al. (2017). *In vitro* and *in vivo* effects of suloctidil on growth and biofilm formation of the opportunistic fungus *Candida albicans*. *Oncotarget* 8, 69972–69982.
- Zhan, X.L., and Guan, K.L. (1999). A specific protein-protein interaction accounts for the *in vivo* substrate selectivity of Ptp3 towards the Fus3 MAP kinase. *Genes Dev.* 13, 2811–2827.

BIBLIOGRAFÍA

Zhang, X., Lester, R.L., and Dickson, R.C. (2004). Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *J. Biol. Chem.* 279, 22030–22038.

Zhang, X., Fang, Y., Jaiseng, W., Hu, L., Lu, Y., Ma, Y., and Furuyashiki, T. (2015). Characterization of tamoxifen as an antifungal agent using the yeast *Schizosaccharomyces pombe* model organism. *Kobe J. Med. Sci.* 61, E54–E63.

Zhou, Y., Wong, C.O., Cho, K.J., Van Der Hoeven, D., Liang, H., Thakur, D.P., Luo, J., Babic, M., Zinsmaier, K.E., Zhu, M.X., et al. (2015). Membrane potential modulates plasma membrane phospholipid dynamics and K-Ras signaling. *Science* 349, 873–876.

ANEXO I

Tabla I. Compuestos de la colección *Prestwick Chemical Library*® que, al menos en dos de los tres rastreos realizados, inhibieron el crecimiento ($\geq 50\%$ respecto al control) de la cepa Y3656 tanto con el vector vacío (YSTH1) como con el IPAC (YSTH2) integrados. La gradación de colores hace referencia al grado de inhibición de los compuestos, indicando los tonos rojos una elevada inhibición, los amarillos una inhibición intermedia, y los tonos verdes una baja inhibición del crecimiento.

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	
Compuesto	Rastreo	D.O. _{600 nm} Vector + Compuesto	D.O. _{600 nm} Vector (Control crecimiento)	% Inhibición Vector (100- (A/B)*100)	D.O. _{600 nm} IPAC + Compuesto	D.O. _{600 nm} IPAC (Control crecimiento)	% Inhibición IPAC (100- (D/E)*100)	% Inhibición IPAC/ % Inhibición Vector (F/C)	D.O. _{600 nm} Vector/ Control crecimiento (A/B)	D.O. _{600 nm} IPAC/ Control crecimiento (D/E)	Vector normalizado/ IPAC normalizado (H/I)
Anfotericina B	1°	0.045	1.256	96.447	0.050	1.225	95.898	0.994	0.036	0.041	0.866
	2°	0.025	0.911	97.254	0.029	0.982	97.046	0.998	0.027	0.030	0.930
	3°	0.030	1.144	97.388	0.000	1.212	100.000	1.027	0.026	0.000	Infinito
Auranofina	1°	0.215	1.262	82.977	0.141	1.232	88.598	1.068	0.170	0.114	1.493
	2°	0.155	0.975	84.135	0.138	1.003	86.277	1.025	0.159	0.137	1.156
	3°	0.265	1.173	77.374	0.086	1.148	92.500	1.195	0.226	0.075	3.017
Bifonazol	1°	0.068	1.264	94.648	0.027	1.240	97.792	1.033	0.054	0.022	2.423
	2°	0.045	0.955	95.251	0.050	0.914	94.530	0.992	0.047	0.055	0.868
	3°	0.016	1.146	98.582	0.015	1.144	98.700	1.001	0.014	0.013	1.091
Bromuro de demecario	1°	0.182	1.272	85.686	0.149	1.241	88.005	1.027	0.143	0.120	1.193
	2°	0.207	0.898	76.990	0.184	0.953	80.664	1.048	0.230	0.193	1.190
	3°	0.193	1.160	83.384	0.137	1.125	87.788	1.053	0.166	0.122	1.361

ANEXO I

Bromuro de tonzonio	1°	0.031	1.250	97.551	0.056	1.216	95.393	0.978	0.024	0.046	0.532
	2°	0.154	0.872	82.339	0.055	0.920	94.023	1.142	0.177	0.060	2.955
	3°	0.010	1.139	99.122	0.039	1.220	96.844	0.977	0.009	0.032	0.278
Cicloheximida	1°	0.495	1.261	60.739	0.395	1.226	67.768	1.116	0.393	0.322	1.218
	2°	0.854	0.926	7.723	0.465	1.000	53.488	6.926	0.923	0.465	1.984
	3°	0.346	1.101	68.537	0.495	1.194	58.549	0.854	0.315	0.415	0.759
Ciclopirox etanolamina	1°	0.017	1.258	98.659	0.029	1.231	97.674	0.990	0.013	0.023	0.577
	2°	0.013	0.993	98.724	0.019	0.950	97.966	0.992	0.013	0.020	0.627
	3°	0.008	1.166	99.335	0.000	1.114	100.000	1.007	0.007	0.000	Infinito
Citrato de clomifeno (Z,E)	1°	0.035	1.240	97.198	0.031	1.221	97.472	1.003	0.028	0.025	1.108
	2°	0.002	0.980	99.830	0.003	1.042	99.744	0.999	0.002	0.003	0.665
	3°	0.000	1.191	100.000	0.000	1.085	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito
Citrato de tamoxifeno	1°	0.067	1.243	94.650	0.037	1.243	97.044	1.025	0.053	0.030	1.810
	2°	0.008	0.930	99.175	0.003	0.941	99.681	1.005	0.008	0.003	2.585
	3°	0.000	1.054	100.000	0.000	1.210	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito
Clioquinol	1°	0.256	1.250	79.556	0.032	1.216	97.367	1.224	0.204	0.026	7.765
	2°	0.136	0.872	84.404	0.706	0.920	23.282	0.276	0.156	0.767	0.203
	3°	0.178	1.139	84.369	0.127	1.220	89.629	1.062	0.156	0.104	1.507

Clorhexidina	1°	0.060	1.243	95.213	0.046	1.243	96.320	1.012	0.048	0.037	1.301
	2°	0.000	0.930	100.000	0.003	0.941	99.681	0.997	0.000	0.003	0.000
	3°	0.000	1.054	100.000	0.000	1.210	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito
Clorhidrato de amorolfina	1°	0.039	1.231	96.800	0.034	1.198	97.151	1.004	0.032	0.028	1.123
	2°	0.029	0.945	96.966	0.033	1.033	96.837	0.999	0.030	0.032	0.959
	3°	0.005	1.106	99.548	0.000	1.206	100.000	1.005	0.005	0.000	Infinito
Clorhidrato de indatralina	1°	0.068	1.263	94.647	0.039	1.198	96.765	1.022	0.054	0.032	1.655
	2°	0.037	0.971	96.155	0.015	0.879	98.256	1.022	0.038	0.017	2.205
	3°	0.003	1.178	99.777	0.000	1.213	100.000	1.002	0.002	0.000	Infinito
Clorhidrato de tosufloxacin	1°	0.193	1.256	84.662	0.475	1.225	61.204	0.723	0.153	0.388	0.395
	2°	0.435	0.911	52.224	0.269	0.982	72.600	1.390	0.478	0.274	1.744
	3°	0.782	1.144	31.647	0.753	1.212	37.860	1.196	0.684	0.621	1.100
Cloroxina	1°	0.070	1.243	94.409	0.109	1.243	91.253	0.967	0.056	0.087	0.639
	2°	0.033	0.930	96.486	0.010	0.941	98.937	1.025	0.035	0.011	3.305
	3°	0.007	1.054	99.336	0.000	1.210	100.000	1.007	0.007	0.000	Infinito
Cloruro de bencetonio	1°	0.059	1.291	95.448	0.035	1.214	97.149	1.018	0.046	0.029	1.596
	2°	0.010	0.943	98.905	0.017	0.949	98.208	0.993	0.011	0.018	0.611
	3°	0.000	1.168	100.000	0.000	1.201	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito

ANEXO I

Cloruro de metilbencetonio	1°	0.056	1.291	95.681	0.031	1.214	97.478	1.019	0.043	0.025	1.713
	2°	0.014	0.943	98.481	0.013	0.949	98.630	1.002	0.015	0.014	1.109
	3°	0.000	1.168	100.000	0.000	1.201	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito
Clotrimazol	1°	0.088	1.229	92.819	0.049	1.243	96.099	1.035	0.072	0.039	1.841
	2°	0.041	0.969	95.805	0.039	1.070	96.324	1.005	0.042	0.037	1.141
	3°	0.076	1.176	93.550	0.000	1.202	100.000	1.069	0.064	0.000	Infinito
Diclorhidrato de alexidina	1°	0.055	1.261	95.629	0.060	1.226	95.087	0.994	0.044	0.049	0.890
	2°	0.030	0.926	96.724	0.037	1.000	96.299	0.996	0.033	0.037	0.885
	3°	0.025	1.101	97.706	0.016	1.194	98.670	1.010	0.023	0.013	1.726
Diclorhidrato de flufenazina	1°	0.162	1.229	86.798	0.064	1.243	94.892	1.093	0.132	0.051	2.585
	2°	0.075	0.969	92.298	0.010	1.070	99.034	1.073	0.077	0.010	7.976
	3°	0.033	1.176	97.205	0.000	1.202	100.000	1.029	0.028	0.000	Infinito
Diclorhidrato de trifluoperazina	1°	0.042	1.229	96.562	0.045	1.243	96.421	0.999	0.034	0.036	0.960
	2°	0.003	0.969	99.725	0.009	1.070	99.128	0.994	0.003	0.009	0.315
	3°	0.015	1.176	98.736	0.000	1.202	100.000	1.013	0.013	0.000	Infinito
Dicloruro de decualinio	1°	0.081	1.240	93.489	0.101	1.221	91.741	0.981	0.065	0.083	0.788
	2°	0.038	0.980	96.156	0.037	1.042	96.481	1.003	0.038	0.035	1.092
	3°	0.011	1.191	99.119	0.000	1.085	100.000	1.009	0.009	0.000	Infinito

Dimalato de tietilperazina	1°	0.051	1.228	95.868	0.043	1.222	96.502	1.007	0.041	0.035	1.181
	2°	0.014	0.990	98.620	0.033	1.004	96.679	0.980	0.014	0.033	0.416
	3°	0.000	1.167	100.000	0.000	1.167	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito
Enilconazol	1°	0.067	1.263	94.726	0.036	1.198	97.016	1.024	0.053	0.030	1.767
	2°	0.066	0.971	93.169	0.032	0.879	96.323	1.034	0.068	0.037	1.858
	3°	0.024	1.178	97.995	0.009	1.213	99.278	1.013	0.020	0.007	2.778
Fluconazol	1°	0.297	1.264	76.526	0.060	1.240	95.130	1.243	0.235	0.049	4.820
	2°	0.433	0.955	54.605	0.408	0.914	55.361	1.014	0.454	0.446	1.017
	3°	0.289	1.146	74.766	0.251	1.144	78.078	1.044	0.252	0.219	1.151
Fumarato de clemastina	1°	0.315	1.229	74.349	0.042	1.243	96.662	1.300	0.257	0.033	7.684
	2°	0.019	0.969	98.074	0.011	1.070	98.941	1.009	0.019	0.011	1.818
	3°	0.027	1.176	97.715	0.000	1.202	100.000	1.023	0.023	0.000	Infinito
Haloprogina	1°	0.180	1.256	85.697	0.117	1.225	90.429	1.055	0.143	0.096	1.494
	2°	0.207	0.911	77.265	0.075	0.982	92.361	1.195	0.227	0.076	2.976
	3°	0.007	1.144	99.399	0.000	1.212	100.000	1.006	0.006	0.000	Infinito
Hexetidina	1°	0.029	1.258	97.705	0.041	1.231	96.699	0.990	0.023	0.033	0.695
	2°	0.000	0.993	100.000	0.005	0.950	99.439	0.994	0.000	0.006	0.000
	3°	0.000	1.166	100.000	0.000	1.114	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito

ANEXO I

Isoconazol	1°	0.050	1.243	96.018	0.042	1.243	96.642	1.007	0.040	0.034	1.186
	2°	0.015	0.930	98.422	0.023	0.941	97.554	0.991	0.016	0.024	0.645
	3°	0.019	1.054	98.197	0.000	1.210	100.000	1.018	0.018	0.000	Infinito
Itraconazol	1°	0.291	1.272	77.114	0.148	1.241	88.085	1.142	0.229	0.119	1.921
	2°	0.486	0.898	45.927	0.162	0.953	82.972	1.807	0.541	0.170	3.176
	3°	0.152	1.160	86.918	0.065	1.125	94.188	1.084	0.131	0.058	2.251
Maleato de metiotepina	1°	0.050	1.240	95.989	0.044	1.221	96.408	1.004	0.040	0.036	1.117
	2°	0.013	0.980	98.707	0.014	1.042	98.688	1.000	0.013	0.013	0.985
	3°	0.001	1.191	99.958	0.000	1.085	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito
Maleato de perhexilina	1°	0.244	1.229	80.126	0.037	1.243	97.064	1.211	0.199	0.029	6.769
	2°	0.041	0.969	95.805	0.016	1.070	98.474	1.028	0.042	0.015	2.748
	3°	0.060	1.176	94.910	0.000	1.202	100.000	1.054	0.051	0.000	Infinito
Miconazol	1°	0.037	1.233	97.010	0.035	1.222	97.167	1.002	0.030	0.028	1.056
	2°	0.014	0.993	98.624	0.010	0.907	98.897	1.003	0.014	0.011	1.247
	3°	0.021	1.091	98.097	0.000	1.180	100.000	1.019	0.019	0.000	Infinito
Nistatina	1°	0.053	1.258	95.797	0.059	1.231	95.236	0.994	0.042	0.048	0.882
	2°	0.028	0.993	97.214	0.039	0.950	95.861	0.986	0.028	0.041	0.673
	3°	0.030	1.166	97.448	0.000	1.114	100.000	1.026	0.026	0.000	Infinito

Nitrato de butoconazol	1°	0.067	1.256	94.695	0.049	1.225	95.980	1.014	0.053	0.040	1.320
	2°	0.030	0.911	96.705	0.028	0.982	97.148	1.005	0.033	0.029	1.155
	3°	0.009	1.144	99.224	0.007	1.212	99.392	1.002	0.008	0.006	1.275
Nitrato de econazol	1°	0.049	1.229	95.993	0.039	1.243	96.903	1.009	0.040	0.031	1.294
	2°	0.018	0.969	98.178	0.014	1.070	98.661	1.005	0.018	0.013	1.361
	3°	0.035	1.176	97.035	0.000	1.202	100.000	1.031	0.030	0.000	Infinito
Nitrato de oxiconazol	1°	0.094	1.291	92.737	0.049	1.214	95.996	1.035	0.073	0.040	1.814
	2°	0.073	0.943	92.226	0.024	0.949	97.470	1.057	0.078	0.025	3.073
	3°	0.079	1.168	93.226	0.000	1.201	100.000	1.073	0.068	0.000	Infinito
Nitrato de sertaconazol	1°	0.039	1.228	96.845	0.053	1.222	95.683	0.988	0.032	0.043	0.731
	2°	0.128	0.990	87.107	0.013	1.004	98.672	1.133	0.129	0.013	9.707
	3°	0.108	1.167	90.757	0.027	1.167	97.686	1.076	0.092	0.023	3.995
Nitrato de sulconazol	1°	0.078	1.262	93.837	0.047	1.232	96.226	1.025	0.062	0.038	1.633
	2°	0.070	0.975	92.854	0.035	1.003	96.544	1.040	0.071	0.035	2.068
	3°	0.056	1.173	95.193	0.000	1.148	100.000	1.050	0.048	0.000	Infinito
Sertralina	1°	0.066	1.263	94.806	0.035	1.198	97.099	1.024	0.052	0.029	1.791
	2°	0.048	0.971	95.023	0.022	0.879	97.460	1.026	0.050	0.025	1.960
	3°	0.015	1.178	98.759	0.000	1.213	100.000	1.013	0.012	0.000	Infinito

ANEXO I

Suloctidil	1°	0.028	1.256	97.800	0.034	1.225	97.204	0.994	0.022	0.028	0.787
	2°	0.008	0.911	99.121	0.022	0.982	97.759	0.986	0.009	0.022	0.392
	3°	0.000	1.144	100.000	0.000	1.212	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito
Terconazol	1°	0.063	1.258	95.002	0.057	1.231	95.399	1.004	0.050	0.046	1.086
	2°	0.023	0.993	97.717	0.015	0.950	98.387	1.007	0.023	0.016	1.415
	3°	0.037	1.166	96.848	0.000	1.114	100.000	1.033	0.032	0.000	Infinito
Tioconazol	1°	0.057	1.243	95.455	0.042	1.243	96.642	1.012	0.045	0.034	1.354
	2°	0.034	0.930	96.379	0.023	0.941	97.554	1.012	0.036	0.024	1.481
	3°	0.008	1.054	99.241	0.006	1.210	99.494	1.003	0.008	0.005	1.499
Toremifeno	1°	0.095	1.250	92.432	0.048	1.216	96.051	1.039	0.076	0.039	1.916
	2°	0.791	0.872	9.289	0.382	0.920	58.490	6.297	0.907	0.415	2.185
	3°	0.059	1.139	94.819	0.062	1.220	94.958	1.001	0.052	0.050	1.028
Voriconazol	1°	0.067	1.272	94.731	0.066	1.241	94.692	1.000	0.053	0.053	0.993
	2°	0.036	0.898	96.029	0.028	0.953	97.028	1.010	0.040	0.030	1.336
	3°	0.033	1.160	97.177	0.016	1.125	98.544	1.014	0.028	0.015	1.939
Zotepina	1°	0.057	1.256	95.491	0.040	1.225	96.714	1.013	0.045	0.033	1.372
	2°	0.020	0.911	97.803	0.029	0.982	97.046	0.992	0.022	0.030	0.744
	3°	0.000	1.144	100.000	0.000	1.212	100.000	1.000	0.000	0.000	Infinito

Tabla II. Compuestos de la colección *Prestwick Chemical Library*® que, al menos en dos de los tres rastreos realizados, inhibieron como mínimo un 50% el crecimiento de la cepa Y3656 con el IPAC integrado y menos del 50% a la cepa con el vector vacío integrado. La gradación de colores señala cuánto mayor es el crecimiento de la cepa con el vector (YSTH1) en comparación con el de la cepa del IPAC (YSTH2), marcando los tonos rojos las diferencias más pequeñas en los crecimientos de ambas cepas, los amarillos una diferencia intermedia, y los tonos verdes una diferencia de crecimiento más acusada.

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	
Compuesto	Rastreo	D.O. _{600 nm} Vector + Compuesto	D.O. _{600 nm} Vector (Control crecimiento)	% Inhibición Vector (100- (A/B)*100)	D.O. _{600 nm} IPAC + Compuesto	D.O. _{600 nm} IPAC (Control crecimiento)	% Inhibición IPAC (100- (D/E)*100)	% Inhibición IPAC/ % Inhibición Vector (F/C)	D.O. _{600 nm} Vector/ Control crecimiento (A/B)	D.O. _{600 nm} IPAC/ Control crecimiento (D/E)	Vector normalizado/ IPAC normalizado (H/I)
Bromperidol	1º	1.252	1.258	0.497	0.095	1.231	92.311	185.822	0.995	0.077	12.941
	2º	1.006	0.993	-1.284	0.066	0.950	93.020	-72.440	1.013	0.070	14.511
	3º	0.805	1.166	30.967	0.611	1.114	45.106	1.457	0.690	0.549	1.258
Bromuro de pinaverio	1º	1.322	1.291	-2.402	0.106	1.214	91.302	-38.016	1.024	0.087	11.773
	2º	0.316	0.943	66.466	0.044	0.949	95.362	1.435	0.335	0.046	7.231
	3º	0.585	1.168	49.909	0.000	1.201	100.000	2.004	0.501	0.000	Infinito
Carbadox	1º	0.734	1.272	42.273	0.355	1.241	71.407	1.689	0.577	0.286	2.019
	2º	0.956	0.898	-6.402	0.188	0.953	80.245	-12.534	1.064	0.198	5.386
	3º	1.164	1.160	-0.323	0.307	1.125	72.675	-224.807	1.003	0.273	3.671
Clorhidrato de butenafina	1º	0.662	1.272	47.936	0.106	1.241	91.469	1.908	0.521	0.085	6.103
	2º	1.060	0.898	-17.981	0.084	0.953	91.154	-5.069	1.180	0.088	13.337
	3º	1.143	1.160	1.487	0.245	1.125	78.186	52.578	0.985	0.218	4.516

ANEXO I

Clorhidrato de clorprotixeno	1°	1.264	1.240	-1.895	0.952	1.221	22.065	-11.645	1.019	0.779	1.307
	2°	1.098	0.980	-12.016	0.099	1.042	90.530	-7.534	1.120	0.095	11.829
	3°	1.238	1.191	-3.882	0.031	1.085	97.108	-25.012	1.039	0.029	35.920
Clorhidrato de pramoxina	1°	1.208	1.291	6.430	1.156	1.214	4.838	0.752	0.936	0.952	0.983
	2°	1.044	0.943	-10.707	0.297	0.949	68.696	-6.416	1.107	0.313	3.536
	3°	0.940	1.168	19.518	0.442	1.201	63.183	3.237	0.805	0.368	2.186
Clorhidrato de tioridazina	1°	0.691	1.233	43.974	0.044	1.222	96.431	2.193	0.560	0.036	15.699
	2°	0.397	0.993	60.060	0.035	0.907	96.139	1.601	0.399	0.039	10.344
	3°	0.547	1.091	49.862	0.642	1.180	45.565	0.914	0.501	0.544	0.921
Clorhidrato de triflupromazina	1°	0.726	1.233	41.135	0.065	1.222	94.713	2.302	0.589	0.053	11.134
	2°	0.328	0.993	67.008	0.045	0.907	95.036	1.418	0.330	0.050	6.646
	3°	1.135	1.091	-4.058	0.351	1.180	70.234	-17.309	1.041	0.298	3.496
Diclorhidrato de zuclopentixol	1°	0.803	1.263	36.470	0.066	1.198	94.512	2.592	0.635	0.055	11.576
	2°	0.630	0.971	35.090	0.033	0.879	96.209	2.742	0.649	0.038	17.123
	3°	0.062	1.178	94.770	0.004	1.213	99.691	1.052	0.052	0.003	16.909
Flucitosina	1°	0.465	1.250	62.841	0.219	1.216	81.983	1.305	0.372	0.180	2.062
	2°	0.617	0.872	29.243	0.393	0.920	57.294	1.959	0.708	0.427	1.657
	3°	0.755	1.139	33.699	0.316	1.220	74.134	2.200	0.663	0.259	2.563

Perfenazina	1°	1.257	1.243	-1.086	1.179	1.243	5.188	-4.777	1.011	0.948	1.066
	2°	0.994	0.930	-6.884	0.318	0.941	66.188	-9.615	1.069	0.338	3.161
	3°	0.860	1.054	18.406	0.208	1.210	82.798	4.498	0.816	0.172	4.743
Sulfato de colistina	1°	1.081	1.258	14.088	0.046	1.231	96.293	6.835	0.859	0.037	23.173
	2°	1.142	0.993	-14.981	0.026	0.950	97.229	-6.490	1.150	0.028	41.495
	3°	1.130	1.166	3.088	0.000	1.114	100.000	32.382	0.969	0.000	Infinito
Tartrato de ifenprodil	1°	0.991	1.229	19.345	0.523	1.243	57.973	2.997	0.807	0.420	1.919
	2°	0.916	0.969	5.545	0.986	1.070	7.826	1.412	0.945	0.922	1.025
	3°	1.071	1.176	8.968	0.545	1.202	54.685	6.098	0.910	0.453	2.009

ANEXO I

Tabla III. Compuestos de la colección *Prestwick Chemical Library*® que, al menos en dos de los cuatro rastreos realizados, permitieron el crecimiento ($\geq 25\%$) de la cepa Y3656 que presenta el IPAC integrado (YSTH2) en presencia de RC en comparación con el control con RC y sin compuesto. La gradación de colores hace referencia al grado de inhibición de los compuestos, indicando los tonos rojos una elevada inhibición, los amarillos una inhibición intermedia, y los tonos verdes una baja inhibición.

		A	B	C	D	E	
Compuesto	Rastreo	D.O. _{600 nm} IPAC + Compuesto	D.O. _{600 nm} IPAC + RC (Control muerte)	D.O. _{600 nm} IPAC (Control crecimiento)	% Inhibición IPAC + Compuesto (100- (A/C)*100)	% Inhibición Control muerte (100-(B/C)*100)	% Recuperación del crecimiento (100-(D/E)*100)
Aripiprazol	1°	0.112	0.091	1.265	91.134	92.834	1.831
	2°	1.277	0.089	1.279	0.176	93.079	99.811
	3°	0.033	0.014	1.266	97.414	98.934	1.537
	4°	0.534	0.000	1.076	50.395	100.000	49.605
Astemizol	1°	1.111	0.064	1.242	10.547	94.836	88.879
	2°	0.949	0.050	1.283	26.033	96.103	72.912
	3°	0.809	0.002	1.052	23.165	99.786	76.786
	4°	0.856	0.000	0.887	3.467	100.000	96.533
Besilato de atracurio	1°	0.130	0.151	1.260	89.696	87.990	-1.939
	2°	1.223	0.050	1.272	3.833	96.049	96.009
	3°	0.082	0.003	1.050	92.192	99.738	7.566
	4°	0.567	0.002	1.142	50.394	99.847	49.529

Besilato de cisatracurio	1°	0.148	0.142	1.206	87.751	88.207	0.517
	2°	1.291	0.087	1.303	0.959	93.304	98.972
	3°	1.036	0.010	1.212	14.483	99.154	85.393
	4°	0.421	0.000	1.012	58.459	100.000	41.541
Carvedilol	1°	0.158	0.091	1.265	87.496	92.834	5.750
	2°	1.261	0.089	1.279	1.427	93.079	98.467
	3°	0.640	0.014	1.266	49.477	98.934	49.990
	4°	0.309	0.000	1.076	71.306	100.000	28.694
Clorhidrato de prazosina	1°	0.398	0.095	1.282	68.970	92.590	25.510
	2°	0.287	0.075	1.302	77.987	94.276	17.278
	3°	0.091	0.016	1.300	93.037	98.750	5.785
	4°	0.499	0.008	1.181	57.730	99.301	41.864
Clorhidrato de raloxifeno	1°	0.923	0.081	1.273	27.510	93.637	70.621
	2°	0.841	0.090	1.273	33.890	92.908	63.523
	3°	0.709	0.000	1.081	34.389	99.954	65.595
	4°	0.498	0.002	0.711	29.944	99.754	69.982
Diclorhidrato de amodiaquina dihidratado	1°	0.936	0.068	1.245	24.829	94.547	73.739
	2°	1.208	0.066	1.277	5.422	94.833	94.283
	3°	0.356	0.006	1.152	69.112	99.457	30.511
	4°	0.601	0.000	0.938	35.964	100.000	64.036

ANEXO I

Diclorhidrato de mitoxantrona	1°	0.764	0.064	1.253	39.064	94.903	58.838
	2°	0.535	0.080	1.268	57.780	93.690	38.329
	3°	0.416	0.001	1.056	60.663	99.882	39.265
	4°	0.222	0.000	0.839	73.494	100.000	26.506
Diclorhidrato de quinacrina monohidratado	1°	1.168	0.068	1.245	6.189	94.547	93.454
	2°	1.239	0.066	1.277	2.995	94.833	96.842
	3°	0.833	0.006	1.152	27.697	99.457	72.152
	4°	0.806	0.000	0.938	14.103	100.000	85.897
DO 897/99	1°	0.222	0.044	1.211	81.709	96.367	15.210
	2°	1.140	0.086	1.285	11.288	93.285	87.899
	3°	0.018	0.004	1.087	98.367	99.586	1.224
	4°	0.383	0.004	1.118	65.749	99.597	33.985
Fluspirilen	1°	1.237	0.095	1.282	3.526	92.590	96.192
	2°	1.289	0.075	1.302	0.999	94.276	98.941
	3°	0.353	0.016	1.300	72.879	98.750	26.198
	4°	0.253	0.008	1.181	78.568	99.301	20.879
Furoato de mometasona	1°	0.122	0.049	1.200	89.829	95.915	6.345
	2°	0.657	0.028	1.239	46.952	97.719	51.952
	3°	1.195	0.000	1.033	-15.654	100.000	115.654
	4°	1.165	0.001	1.061	-9.779	99.882	109.790

Gefitinib	1°	0.100	0.048	1.212	91.770	96.019	4.425
	2°	1.199	0.105	1.212	1.011	91.312	98.893
	3°	0.999	0.005	0.913	-9.362	99.480	109.411
	4°	0.618	0.000	0.636	2.832	100.000	97.168
Isetionato de pentamidina	1°	0.804	0.044	1.211	33.650	96.367	65.081
	2°	0.440	0.086	1.285	65.784	93.285	29.480
	3°	0.960	0.004	1.087	11.686	99.586	88.265
	4°	1.010	0.004	1.118	9.642	99.597	90.319
Lactato de prenilamina	1°	0.702	0.044	1.211	42.073	96.367	56.341
	2°	1.150	0.086	1.285	10.510	93.285	88.734
	3°	0.236	0.004	1.087	78.307	99.586	21.368
	4°	0.732	0.004	1.118	34.519	99.597	65.341
Maleato de tegaserod	1°	0.522	0.142	1.206	56.742	88.207	35.672
	2°	0.558	0.087	1.303	57.214	93.304	38.680
	3°	0.874	0.010	1.212	27.852	99.154	71.910
	4°	0.771	0.000	1.012	23.882	100.000	76.118
Mebendazol	1°	0.137	0.066	1.198	88.580	94.530	6.294
	2°	0.403	0.088	1.281	68.508	93.128	26.436
	3°	0.019	0.005	1.148	98.389	99.543	1.159
	4°	0.373	0.001	1.140	67.310	99.956	32.661

ANEXO I

Mesilato de doxazosina	1°	0.599	0.081	1.273	52.962	93.637	43.440
	2°	0.791	0.090	1.273	37.819	92.908	59.294
	3°	0.770	0.000	1.081	28.747	99.954	71.240
	4°	0.737	0.002	0.711	-3.695	99.754	103.704
Mesilato de gabexato	1°	0.223	0.055	1.230	81.846	95.569	14.360
	2°	0.720	0.089	1.277	43.609	93.071	53.144
	3°	0.356	0.006	1.157	69.267	99.460	30.356
	4°	0.586	0.001	1.051	44.244	99.929	55.725
Metergolina	1°	1.014	0.064	1.253	19.114	94.903	79.859
	2°	1.213	0.080	1.268	4.299	93.690	95.411
	3°	0.372	0.001	1.056	64.828	99.882	35.095
	4°	0.686	0.000	0.839	18.157	100.000	81.843
Pamoato de pirvinio	1°	0.192	0.055	1.230	84.370	95.569	11.718
	2°	0.389	0.089	1.277	69.524	93.071	25.300
	3°	0.886	0.006	1.157	23.449	99.460	76.423
	4°	1.067	0.001	1.051	-1.522	99.929	101.523
Reserpina	1°	0.836	0.081	1.273	34.344	93.637	63.322
	2°	0.948	0.090	1.273	25.481	92.908	72.573
	3°	0.018	0.000	1.081	98.312	99.954	1.643
	4°	0.010	0.002	0.711	98.628	99.754	1.129

Sertindol	1°	0.038	0.049	1.200	96.832	95.915	-0.956
	2°	0.265	0.028	1.239	78.603	97.719	19.562
	3°	0.699	0.000	1.033	32.349	100.000	67.651
	4°	0.920	0.001	1.061	13.313	99.882	86.671
Terfenadina	1°	0.932	0.064	1.242	24.960	94.836	73.681
	2°	1.130	0.050	1.283	11.925	96.103	87.591
	3°	0.745	0.002	1.052	29.247	99.786	70.690
	4°	0.769	0.000	0.887	13.275	100.000	86.725
Tosilato de clofilio	1°	0.088	0.068	1.245	92.960	94.547	1.678
	2°	0.551	0.066	1.277	56.860	94.833	40.041
	3°	0.941	0.006	1.152	18.320	99.457	81.580
	4°	0.581	0.000	0.938	38.097	100.000	61.903
Yoduro de propidio	1°	1.248	0.056	1.225	-1.917	95.458	102.008
	2°	1.238	0.074	1.289	3.919	94.276	95.843
	3°	0.471	0.003	1.155	59.212	99.740	40.634
	4°	1.029	0.007	1.118	8.004	99.329	91.942

ANEXO II

Esta tesis doctoral ha dado lugar a la publicación de los siguientes trabajos científicos:

- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Sellers-Moya, Á., Molina, M., and Martín, H. (2020). Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int. Microbiol.* 23, 107–119.
- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Alonso-Rodríguez, E., Fernández-Acero, T., Molina, M., and Martín, H. (2020). Rewiring the yeast cell wall integrity (CWI) pathway through a synthetic positive feedback circuit unveils a novel role for the MAPKKK Ssk2 in CWI pathway activation. *FEBS J.* 1–21.



Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on

Elena Jiménez-Gutiérrez¹ · Estíbaliz Alegría-Carrasco¹ · Ángela Sellers-Moya¹ · María Molina¹ · Humberto Martín¹ 

Received: 14 June 2019 / Revised: 10 July 2019 / Accepted: 11 July 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

The *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity (CWI) pathway took this name when its role in the cell response to cell wall aggressions was clearly established. The receptors involved in sensing the damage, the relevant components operating in signaling to the MAPK Slt2, the transcription factors activated by this MAPK, as well as some key regulatory mechanisms have been identified and characterized along almost 30 years. However, other stimuli that do not alter specifically the yeast cell wall, including protein unfolding, low or high pH, or plasma membrane, oxidative and genotoxic stresses, have been also found to trigger the activation of this pathway. In this review, we compile almost forty non-cell wall-specific compounds or conditions, such as tunicamycin, hypo-osmotic shock, diamide, hydroxyurea, arsenate, and rapamycin, which induce these stresses. Relevant aspects of the CWI-mediated signaling in the response to these non-conventional pathway activators are discussed. The data presented here highlight the central and key position of the CWI pathway in the safeguard of yeast cells to a wide variety of external aggressions.

Keywords Yeast cell wall · CWI pathway · Slt2 · MAPK · Stress response

Introduction

Saccharomyces cerevisiae has to deal with numerous and different stress conditions in its natural environment. Signal transduction pathways mediated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are one of the main mechanisms used by yeast cells to adequately respond to external stimuli in order to adapt and survive (Chen and Thorner 2007). MAPK signaling pathways share a common structure in all eukaryotic cells, from yeast to human, including a central module of three protein kinases acting like a phosphorylation cascade: the MAPKKK (MAPK kinase kinase), the MAPKK (MAPK kinase), and the MAPK. This module is activated by upstream components, such as kinases of the PAK or PKC family and small and/or heterotrimeric GTPases, which receive and

transmit the external signal from a receptor/sensor located at the plasma membrane (Morrison 2012).

Among the MAPK routes existing in *S. cerevisiae*, the cell wall integrity (CWI) pathway is mainly involved in maintaining the stability of the cell wall against aggressions that threaten this essential superficial structure (Levin 2011). To detect disturbances in the cell wall, this pathway possesses a set of membrane-spanning mechanosensors, namely Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2, and Mtl1, with a nanospring-like extracellular region expanding into the wall (Jendretzki et al. 2011). These sensors activate the Rho1 GTPase, preferentially through the GDP/GTP exchange factor (GEF) Rom2 to which they interact with their cytoplasmic tails. There are two other Rho1 GEFs, Rom1 and Tus1. The former is functionally redundant to Rom2, but with Rom2 being the major isoenzyme, whereas the latter is responsible for the cell cycle-specific activation of Rho1 (Krause et al. 2012). Rho1 activity is negatively regulated by four GTPase-activating proteins (GAPs), Bem2, Sac7, Bag7, and Lrg1, being Bem2 and Sac7 the Rho1 GAPs mainly involved in downregulating the CWI pathway in response to cell wall stress (Martin et al. 2000). Activated Rho1 interacts with Pkc1 (Heinisch and Rodicio 2018), which triggers the phosphorylation cascade composed by the MAPKKK Bck1, the two MAPKKs Mkk1 and Mkk2, and the downstream MAPK Slt2 (Fig. 1). Once dually phosphorylated on the threonine and tyrosine at its activation loop, Slt2

Elena Jiménez-Gutiérrez, Estíbaliz Alegría-Carrasco and Ángela Sellers-Moya contributed equally to this work.

- ✉ María Molina
molmifa@ucm.es
- ✉ Humberto Martín
humberto@ucm.es

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (IRICIS), Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

Table 1 Non-cell wall-specific stimuli that trigger the activation of the CWI pathway

Stress type	Agent/stimulus	Involved sensors	Monitored readout	Prevention by osmotic stabilization	Actin depolarization	References
Protein unfolding	Tunicamycin	Wsc1	<i>MPK1-LacZ</i> expression P-Slt2	Sensitivity: no		(Bonilla and Cunningham 2003; Chen et al. 2005; Babour et al. 2010; Rousseau and Bertolotti 2016)
	DTT		<i>PTP2p</i> -GFP expression P-Slt2			(Mizuno et al. 2018; Chen et al. 2005)
	β -Mercaptoethanol		P-Slt2			(Chen et al. 2005)
	Phytosphingosine (PHS)		P-Slt2			(Piña et al. 2018)
Low pH	Hydrochloric acid to pH 2.8	Mid2	Septin delocalization (ERSU pathway) <i>PST1p-LACZ</i> Phospho-Slt2 P-Slt2	Sensitivity: yes Activation: no Sensitivity: yes Activation: yes (attenuation)		(Claret et al. 2005)
High pH	35 mM KOH pH 8.2/ 50 mM Tris pH 8.3 buffered media	Wsc1			No	(Serrano et al. 2006; Kwon et al. 2016)
	Pn-AMP1 (a small cationic Cys/Arg-rich antimicrobial peptide)	Wsc1	Sensitivity			(Kwon et al. 2016)
Plasma membrane stress	Compressive mechanostress (7 psi pressure)	Mid2	Pkc1-GFP translocation to the plasma membrane			(Mishra et al. 2017)
	Compressive mechanostress (0.4 MPa pressure)	Mid2	Pkc1-GFP translocation to the plasma membrane and Nuclear delocalization of Slt2 In vitro protein kinase assays P-Tyr Slt2 P-Slt2 P-Slt2		Yes	(Delarue et al. 2017)
	Hypo-osmotic shock				Yes	(Kamada et al. 1995; Davenport et al. 1995; Hatakeyama et al. 2017)
	SDS				Yes	(Queralt and Igual 2005; Delley and Hall 1999)
	Chlorpromazine		In vitro protein kinase assays			(Kamada et al. 1995)
	Tea tree oil/amphotericin B/nystatin		lexA- <i>RLM1-lacZ</i> reporter			(Straede et al. 2007)
	Acetic acid	Wsc1	P-Slt2			(Mollapour and Piper 2006; Mollapour et al. 2009)
	High temperature	Mid2/Wsc1	In vitro protein kinase assays P-Slt2	Sensitivity: yes Activation: yes	Yes	(Kamada et al. 1995; Verna et al. 1997; Gray et al. 1997; Martin et al. 2000; Ketela et al. 1999; Rajavel et al. 1999; Mensonides et al. 2005)

Table 1 (continued)

Stress type	Agent/stimulus	Involved sensors	Monitored readout	Prevention by osmotic stabilization	Actin depolarization	References
Oxidative stress	Low temperature	Wsc	P-Slt2	Sensitivity: yes	No	(Corcoles-Saez et al. 2012)
	13-Hydroperoxylinoleic acid (LoOOH)		P-Slt2		Yes	(Alic et al. 2003)
	L-Dopa and other catecholamines (adrenaline noradrenaline dopamine)	Wsc1	P2xRLM1-LacZ P-Slt2			(Staleva et al. 2004)
	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Mit1 Mid2/Wsc1	P2xRLM1-LacZ P-Slt2	Phosphorylation: no	Yes	(Staleva et al. 2004; Vilella et al. 2005; Jin et al. 2013)
	Diamide	Mit1	P-Slt2	Phosphorylation: yes	Yes	(Vilella et al. 2005)
Genotoxic stress	Chloroquine	Wsc1	Pkc1-GFP localization P-Slt2	Sensitivity: yes (at low doses of chloroquine)		(Baranwal et al. 2014)
	Cadmium	Mid2	P-Slt2			(Xiong et al. 2015)
	Zinc-oxide nanoparticles	Wsc1	P-Slt2			(Babele et al. 2018)
	Valproic acid		P-Slt2	Sensitivity: no		(Golla et al. 2016)
	Hydroxyurea		P-Slt2	Sensitivity: no Phosphorylation: no		(Queralt and Igual 2005; Soriano-Carot et al. 2012; Liu and Levin 2018)
Metalloids	Methyl methanesulfonate (MMS)		Slt2-GFP abundance and localization P-Slt2	Sensitivity: no Phosphorylation: no		(Bandyopadhyay et al. 2010; Soriano-Carot et al. 2012; Liu and Levin 2018)
	Phleomycin		P-Slt2	Sensitivity: no Phosphorylation: no		(Soriano-Carot et al. 2012)
	UV irradiation		P-Slt2	Sensitivity: no/yes (Bryan) Phosphorylation: no		(Bryan et al. 2004; Soriano-Carot et al. 2012)
	8-Methoxypsoralen (8-MOP)/UVA		P-Slt2	Sensitivity: yes		(Dardalhon et al. 2009)
	Arsenite [As(III)] Arsenate [As(V)]		Slt2 abundance P-Slt2 P-Slt2	Sensitivity: yes		(Ahmadpour et al. 2016) (Matia-Gonzalez and Rodriguez-Gabriel 2011)
TORC1 inhibition	Rapamycin	Mid2/Wsc1	P-Slt2 Slt2-regulated gene expression In vitro protein kinase assays (Sic1-Thr ¹⁷³ phosphorylation) P-Slt2	Activation: yes Sensitivity: yes Actin depolarization: yes	Yes	(Krause and Gray 2002; Torres et al. 2002; Soulard et al. 2010; Moreno-Torres et al. 2015)
	Caffeine			Phosphorylation: yes		(Martin et al. 2000; Kuranda et al. 2006)
	Latrunculin B	No	P-Slt2	Activation: partial	Yes	(Harrison et al. 2001)

Table 1 (continued)

Stress type	Agent/stimulus	Involved sensors	Monitored readout	Prevention by osmotic stabilization	Actin depolarization	References
Actin depolymerization			Morphogenesis-checkpoint assay			
Carbonyl stress	Methylglyoxal	Neither Wsc1 nor Mid2	P-Slt2		Yes	(Nomura and Inoue 2015)
Others	Quercetin		P-Slt2			(Vilaca et al. 2012)
	Cesium chloride		P-Slt2	Sensitivity: yes		(Casagrande et al. 2009)
	Sodium Vanadate		P-Slt2	Phosphorylation: yes		(Martin et al. 2000)
	Ethanol		Slt2-regulated gene expression			(Udom et al. 2019)

specifically removes the intron from the mRNA of the transcription factor gene *HAC1*. This leads to Hac1 efficient translation and translocation to the nucleus, triggering the transcriptional program of the UPR, including the expression of genes encoding chaperones and folding enzymes (Mori 2015).

More than 15 years ago was first observed that the ER stress activated *SLT2* transcription (Bonilla and Cunningham 2003). The relation of the UPR with the CWI pathway was further uncovered by Chen et al. (2005). These authors clearly showed that the lack of genes involved in the Slt2-mediated pathway caused sensitivity to tunicamycin, DTT, or β -mercaptoethanol, typical agents that induce the appearance of unfolded proteins and therefore trigger the UPR response. The participation of the CWI pathway in this response was clear as the treatment with these compounds led to Slt2 phosphorylation (Chen et al. 2005). The CWI pathway is likely activated to prevent cell wall damage originated as a consequence of ER dysfunction. Lately, Slt2 was shown to be also important in the regulation of the proteasome homeostasis in response to distinct stresses, including those activating the UPR, such as tunicamycin treatment (Rousseau and Bertolotti 2016).

Providing an illustrative example of how signaling connects cellular processes, cell wall stress was later shown to activate the UPR in an Ire1-dependent manner, highlighting the importance of a reinforced folding capacity of the secretory pathway to face a cell wall aggression. Interestingly, under cell wall stress, UPR activation was shown to be dependent on CWI pathway components, namely Slt2, Mid2, and Swi6. Furthermore, the UPR was revealed essential for cell wall maintenance (Scrimale et al. 2009). Thus, the UPR and CWI pathways were drawn as interdependent regulatory circuits that allow yeast to respond to ER and cell wall stresses. Recently, the tyrosine phosphatase Ptp2 was shown to be transcriptionally induced in response to ER stress by the CWI pathway, in an Slt2 and Rlm1-dependent manner. The increased Ptp2 levels impact on the HOG pathway, downregulating Hog1 MAPK activity during the ER stress response (Mizuno et al. 2018). However, the functional significance of this effect is far from clear, since deletion of *PTP2* results in resistance to tunicamycin (Mizuno et al. 2018) and the Hog1 activity has an important role in ER stress survival (Bicknell et al. 2010; Torres-Quiroz et al. 2010).

In addition to the UPR pathway, set in motion by Ire1, an additional ER stress surveillance (ERSU) pathway was identified. This pathway delays ER inheritance and cytokinesis and alters septins upon ER stress (Babour et al. 2010). These authors proposed that the ERSU pathway protected cells from deleterious effects of inheriting stressed ER. By activating this pathway, the cortical ER (cER) is retained in the mother cell until it replenishes ER function. Slt2, as well as other components of the CWI pathway, is necessary to mediate the ERSU-triggered events, which are clearly distinct from the UPR

pathway (Babour et al. 2010). Recently, it was proposed that ER stress elevates phytosphingosine (PHS), which in turn activates the ERSU pathway to ensure future daughter-cell viability. Consequently, treatment of ER-stressed cells with myriocin, a sphingolipid biosynthetic pathway inhibitor, reduced the levels of Slt2 phosphorylation whereas addition of PHS leads to Slt2 phosphorylation, and in general to the ERSU pathway activation (Piña et al. 2018). The targets of Slt2 under ER stress are yet unknown.

Changes in external pH are sensed by the CWI pathway

S. cerevisiae can survive in a rather wide range of ambient pH, being their optimal growth in a mild acidic environment (pH 5.0–6.0). This acidic condition is achieved by the activity of the plasma membrane ATPase Pma1, which exports protons and therefore maintains an extracellular low pH (Serrano et al. 1986). For this reason, *S. cerevisiae* shows higher tolerance to low than high pH, being able to grow at pH values as low as 3.0. However, it is interesting to note that the CWI pathway senses and gets activated in response to low pH stress. This activation is reduced but not prevented by sorbitol, whereas the sensitivity of CWI pathway mutants to low pH is eliminated when growing on sorbitol-stabilized media (Claret et al. 2005). Therefore, some cell wall alteration could be at the origin of the CWI stimulation. Consistently, the activation of the pathway is dependent on the Mid2 mechanosensor (Claret et al. 2005).

Adaptation to pH alkalization in *S. cerevisiae* involves various responses and the participation of different signaling pathways (Serra-Cardona et al. 2015). Among them, the CWI pathway plays a key role in the adaptive response to this environmental stress. Two independent screening studies on gene-disruption mutants showed that the lack of *BCK1* and *SLT2* led to alkaline pH sensitivity (Giaever et al. 2002; Serrano et al. 2004). Moreover, when Pn-AMP1, a small cationic Cys/Arg-rich antimicrobial peptide with alkalinizing properties, was added to cultures of *bck1*Δ or *slt2*Δ strains, these mutant cells failed to grow (Kwon et al. 2016). The work conducted by Serrano et al. in 2006 showed that Slt2 was specifically activated under alkaline stress, and this activation had a fast and transient nature (5–15 min). *bck1*Δ, *slt2*Δ, *swi4*Δ, and *swi6*Δ strains showed not to be capable to grow on alkaline medium. Interestingly, lack of Wsc1 but not Wsc2, Wsc3 or Mid2 led to alkali sensitivity, pointing that Wsc1 was the CWI pathway component responsible for sensing the stress. The Wsc1 Tyr³⁰³ conserved intracellular residue and the whole extracellular domain was shown to be crucial for alkaline pH tolerance. They, therefore, proposed that the external alkaline pH might be affecting the glucan portion of the cell wall, thus activating the CWI pathway through Wsc1 and

leading to Slt2 activation and induction of genes encoding cell wall proteins, such as *GSC2/FKS2*, *DFG5*, *SKT5*, or *CRH1* (Serrano et al. 2006).

The CWI pathway responds to plasma membrane stress

Although treatment of yeast cells with compounds that directly alter the plasma membrane, such as SDS, chlorpromazine, or amphotericin B/nystatin, results in a rapid CWI activation (Table 1), three physical insults that ultimately affect this structure and also led to Slt2 phosphorylation have been experimentally addressed in more detail: heat or cold treatment, hypo-osmotic shock, and compressive mechanical stress.

High and low temperatures

Growth at elevated temperatures was the first environmental condition to be related to the MAPK Slt2 (Torres et al. 1991) and the first one shown to stimulate the CWI pathway (Kamada et al. 1995). Although the molecular basis is still not clear, several mechanisms related to plasma membrane stress could contribute to CWI activation by high temperature. First, the increased membrane fluidity promoted by heat could cause a plasma membrane stretching. Second, the trehalose production in response to heat stress could be altering the turgor pressure. In fact, Slt2 is hardly activated in a *tps1* mutant that is unable to accumulate trehalose (Mensonides et al. 2005). Moreover, the involvement of the different CWI receptors in the detection of this stimulus is controversial. Although the Wsc membrane sensors were firstly implicated in sensing high temperature (Gray et al. 1997; Verna et al. 1997), later reports suggested that Mid2 also act as a CWI pathway sensor for this stress (Rajavel et al. 1999; Ketela et al. 1999; Martin et al. 2000).

The CWI pathway has also a role in cold adaptation (Corcoles-Saez et al. 2012). Mutants affected in Wsc1, Bck1, or Slt2 are unable to grow at 12 °C and catalytically active Slt2 is required to restore cold resistance. However, Slt2 activation under cold treatment does not lead to Rlm1 and Swi4/6 upregulation but seems to impinge on the TORC1–cAMP–PKA signaling network (Corcoles-Saez et al. 2012).

Hypo-osmotic shock

Changes in extracellular osmolyte concentration require the rapid modification of the intracellular abundance of solutes to maintain the osmotic equilibrium. When yeast cells face hyperosmotic stress, the HOG pathway is activated, resulting in the phosphorylation of the Hog1 MAPK. Hog1 activation leads to an increase of intracellular glycerol by both induction of genes involved in glycerol biosynthesis and uptake and

inhibition of the plasma membrane aquaglyceroporin Fps1 with subsequent blockade of glycerol efflux. On the contrary, a hypo-osmotic shock is palliated through the opening of Fps1, which allows the efflux of glycerol and thus restores the osmotic equilibrium and prevents bursting (Hohmann 2015). The opening of Fps1 seems to depend on the CWI MAPK Slt2 (Ahmadpour et al. 2016).

Hypo-osmotic shock also behaves like a plasma membrane stress, since it results in a marked increase in turgor pressure and consequently provokes a plasma membrane stretching. The CWI pathway has been reported to participate in the response to a rapid drop in the external osmolarity. This stress leads to fast and transient phosphorylation of Slt2 that requires upstream kinases Mkk1/2, Bck1, and Pkc1 (Kamada et al. 1995; Davenport et al. 1995). However, it is unclear how the signal reaches the CWI pathway kinases, as well as the elicited output. Upon hypo-osmotic shock, Ypk1 and Ypk2 kinases support Rho1 localization at the bud cortex through flippase inhibition and phosphatidylserine spatial reorganization (Hatakeyama et al. 2017). In *cho1Δ* cells, lacking the only gene encoding phosphatidylserine synthase, the cortical localization of both Rho1 and Pkc1 is lost following this stress. However, phosphorylation of Slt2 in response to hypo-osmotic shock was observed in *cho1Δ* cells, indicating that localization of these upstream CWI components at the bud cortex is not essential for the downstream MAPK cascade activation (Hatakeyama et al. 2017). It is interesting to note that, in contrast to other stimuli, such as heat shock or latrunculin treatment (see below), hypo-osmotic shock does not lead to Slt2 activation in cells containing the constitutively active *BCK1-20* allele as the only Bck1 source. This suggests that hypo-osmotic shock might lead to Bck1 activation through a mechanism different from other stresses (Harrison et al. 2004). In sum, we still have a very poor idea of how the pathway is activated by this stress.

Compressive mechanical stress

High extracellular pressure not only affects the cell wall but also the plasma membrane integrity, leading to cell lysis. Much insight on the signaling components that mediate the response to mechanical compression has been obtained by using a microfluidic platform to specifically trigger compressive stress. The Wsc1 sensor was known to act as a mechanosensor capable of sensing and responding to turgor pressure on the cell wall and plasma membrane caused by hypo-osmotic or heat shock (Dupres et al. 2009). However, lack of Wsc1 did not affect translocation to the plasma membrane of Pkc1-GFP, a reporter protein of the CWI activation, in cells subjected to compressive mechanical stress, (Mishra et al. 2017). In contrast, Rho1-GFP and Pkc1-GFP translocation to the plasma membrane was not observed upon mechanostress in the absence of Mid2, indicating that this is

the sensor of this stress. High extracellular pressure also activated calcium signaling and specifically calcineurin, which suggests that the CWI and calcineurin pathways have cooperative roles. Consistently, a double mutant defective in the regulatory calcineurin component Cnb1 and the MAPK Slt2 suffered exacerbated cell lysis upon compressive stress (Mishra et al. 2017).

A parallel study carried out by Delarue et al. (2017) using a similar experimental approach also demonstrated the key role of the CWI pathway in response to compressive mechanical stress. These authors found that Slt2-GFP shifted from the nucleus to the cytoplasm and Pkc1-GFP translocated from the bud neck to the plasma membrane. Moreover, they showed that survival under mechanostress conditions not only requires the Mid2-activated CWI pathway but also the SMuSh osmosensing pathway (so-called for activation of the MAPKKK Ste11 through Mucin Msb2/Sho1 of the HOG pathway). When both pathways are dysfunctional, cells lyse at relatively low pressure and therefore these authors name this mechanosensory system the SCWISH (survival through the CWI and SMuSh) network (Delarue et al. 2017).

The CWI pathway-mediated response to oxidative stress

Some compounds and physiological conditions increase the number of reactive oxygen species (ROS) inside the cell, causing serious damage to cellular components and threatening cell integrity. Response to this oxidative stress by yeast cells is very complex and includes the activation of the CWI.

The lipid hydroperoxides were the first described oxidants able to induce the CWI pathway activation. These compounds promote oxidative damage of membrane lipids and proteins. Slt2 phosphorylation increased after 5 min of linoleic acid hydroperoxide (13-hydroperoxylinoleic acid; LoaOOH) treatment and decreased considerably after 30 min, suggesting a rapid and transient activation of the pathway. Consequently, *SLT2* deletion rendered cells sensitive to this compound. Although little was investigated about how the stimulus is detected and transduced, it was demonstrated that Slt2 is important in regulating transcripts related to cell surface and metabolism after lipid hydroperoxide exposure (Alic et al. 2003).

L-Dopa and other catecholamines, as well as hydrogen peroxide (H₂O₂), were also shown to activate the CWI pathway (Staleva et al. 2004). The list of oxidizing agents that were able to trigger this pathway soon included the thiol oxidant compound diamide (Vilella et al. 2005). However, these agents differ in the mechanisms leading to Slt2 activation. Diamide likely alters cell wall proteins by oxidizing them, and therefore osmotic stabilization by sorbitol prevents CWI activation in response to this compound. The stress promoted by diamide through the CWI pathway is mostly detected by

Mtl1 and then transduced through regular elements of the route: Rom2, Pkc1, and the MAPK module (Bck1, Mkk1/2, and Slt2), leading to the activation of the transcriptional factor Rlm1 (Vilella et al. 2005). In contrast, H₂O₂ exerts its action at the intracellular level, as sorbitol addition does not prevent MAPK activation. In this case, the signal is also transduced through Rom2, Pkc1, and the MAPK module but the oxidative stress is partially sensed by cell wall sensors Mid2 and Mtl1. Both H₂O₂ and diamide cause actin cytoskeleton depolarization (Fig. 1), but in an Mtl1-dependent manner in the case of diamide, supporting Mtl1 function as sensor for diamide-induced damage. After treatment with this agent, Pkc1 localizes to the cell periphery and cell walls become thicker due to the induction of the CWI-mediated compensatory mechanism. After H₂O₂ treatment, actin cables are rapidly restored if Pkc1 is overexpressed (Vilella et al. 2005). Interestingly, Mtl1 is also required to inactivate both Tor1 and Ras2 functions in response to H₂O₂, and the absence of Mtl1 renders cells sensitive to this oxidative stress (Petkova et al. 2010). All this evidence indicates that Mtl1 is a key sensor for oxidative stress.

A remarkable output of the CWI pathway activation by H₂O₂ is the Slt2-mediated destruction of cyclin C. Under this oxidative stress, the MAPK Slt2 phosphorylates cyclin C, which translocates from the nucleus to the cytoplasm, allowing the expression of stress response genes that are repressed by the Cdk8 kinase module (CKM) formed by cyclin C, Cdk8, Med12, and Med13. Nuclear release of cyclin C requires the previous degradation of Med13, triggered by Slt2 and Snf1 (Jin et al. 2014, 2015; Willis et al. 2018). In the cytoplasm, before its ubiquitin-mediated proteolysis, cyclin C promotes mitochondrial fission, which facilitates survival to exogenous H₂O₂ stress. Therefore, Slt2 plays an important role in coordinating oxidative stress-induced gene induction and mitochondrial fission through cyclin C relocalization and degradation (Krasley et al. 2006; Cooper et al. 2014). Interestingly, whereas Mtl1 and either Wsc1 or Mid2 are required jointly to induce cyclin C destruction under low oxidative stress conditions (0.4 mM H₂O₂), in cells exposed to elevated reactive oxygen concentration (0.8 mM H₂O₂) either Mtl1p or Wsc1p/Mid2p group is sufficient to induce cyclin C destruction (Jin et al. 2013). In any case, the removal of all these receptors is necessary for blocking Slt2 phosphorylation in response to H₂O₂ (Jin et al. 2013).

There are other compounds whose ability to activate the CWI pathway has been also explained in terms of their oxidative nature. This is the case of (i) chloroquine, an antimalarial drug that increases intracellular ROS levels in *S. cerevisiae* and causes cell death (Islahudin et al. 2013); (ii) cadmium, an important environmental pollutant heavy metal and one of the major components of cigarette smoke that is of special interest because it has been associated with various cancers, neurological disorders, and reproductive system defects

(Xiong et al. 2015); (iii) zinc-oxide nanoparticles, a class of nanomaterials broadly used nowadays for different applications such as drug delivery and food or cosmetics production, but generating health problems to consumers upon prolonged exposure (Babele et al. 2018); and (iv) valproic acid, a short-chain fatty acid that is widely prescribed to treat psycho-neurologic disorders and is considered to have potential anti-cancer properties (Golla et al. 2016). Treatment of yeast cells with any of these four agents was shown to induce Slt2 phosphorylation, and removal of this MAPK rendered cells sensitive to them. Interestingly, Wsc1 seems to be the sensor that triggers CWI pathway activation in response to these stimuli, except for cadmium-induced stimulation that is mediated by Mid2 (Xiong et al. 2015).

Genotoxic stress impinges in the CWI pathway at the MAPK level

DNA damage can impair the correct function of cellular processes, and even induce cell death when severe. Thus, DNA surveillance and effective repairing mechanisms are essential to maintain genome integrity. This is mediated by a set of signaling cascades included in the DNA damage response (DDR) network (Harper and Elledge 2007).

Bryan et al. (2004) reported that *slt2* mutant cells displayed decreased cell viability after UV irradiation. Soon after, strong phosphorylation of Slt2 in cells exposed to hydroxyurea (HU), a DNA replication blocking agent, as well as hypersensitivity to this compound of *slt2*Δ and *pkc1*Δ mutants, was described (Queralt and Igual 2005). The genotoxic combination 8-methoxypsoralen (8-MOP) plus ultraviolet A (UVA) induced Slt2 upregulation and phosphorylation, and the mutant defective in this MAPK showed reduced survival compared with wild-type cells after treatment with 8-MOP/UVA, 3-carbethoxypsoralen/UVA, or 1,6-dioxapyrene/UVA (Dardalhon et al. 2009).

Distinct findings further connected the CWI pathway with the response to DNA damage. In a phosphoproteomic study, in addition to the phosphorylation of conserved residues within the Slt2 activating loop, other two Slt2 residues (S423 and S428) were detected phosphorylated after incubation with the alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) that causes methylation of DNA bases (Albuquerque et al. 2008). Interestingly, caffeine treatment also resulted in the phosphorylation of these same residues of Slt2, which was shown to be dependent on the DNA damage checkpoint kinases, Mec1/Tel1 and Rad53 (Truman et al. 2009). Furthermore, the amount of Slt2 increased and localized in the nucleus when yeast cells are exposed to MMS, where it seemed to be required for appropriate regulation of ribonucleotide reductase genes in response to DNA damage (Bandyopadhyay et al. 2010). Moreover, both *SLT2* and *BCK1* interact genetically with different DNA damage

checkpoint genes (Bandyopadhyay et al. 2010). Soriano-Carot et al. (2012) connected again the MAPK Slt2 to the maintenance of genome integrity after treatment with diverse genotoxic agents, such as HU, MMS, the double-strand break inductor phleomycin, and UV irradiation, which causes covalent cross-linking of adjacent pyrimidine bases. This study revealed that, independently of the DNA integrity checkpoint, Slt2 becomes phosphorylated and thus activated as a result of the DNA damage, and that the lack of this MAPK results in hypersensitivity to these genotoxic treatments (Soriano-Carot et al. 2012). In the same work, Slt2 was found to be essential for the Swe1 degradation necessary to restore the cell cycle after HU treatment.

On the whole, all these results suggest that a functional Slt2 is crucial to cope with DNA damage, independently of the genotoxic mechanism. Nevertheless, Soriano-Carot et al. (2014) observed that the activity of Pkc1 was necessary for the activation of the DNA integrity checkpoint kinases Mec1 and Tel1 in a MAPK cascade-independent manner, and that Pkc1 suffered a Tel1-dependent phosphorylation in response to DNA damage, suggesting the existence of a feedback regulatory loop (Soriano-Carot et al. 2014).

Although it was reported that the lack of the Wsc receptors of the CWI pathway resulted in the hypersensitivity of cells to genotoxic agents (Zu et al. 2001; Leduc et al. 2003), Liu and Levin (2018) recently showed that genotoxic stress is sensed intracellularly at the MAPK level. These authors demonstrated that the activation of Slt2 does not rely on the stimulation of the upstream kinases in such conditions (Liu and Levin 2018). The instigator of Slt2 phosphorylation due to DNA damage by HU or MMs is the ubiquitin-mediated proteasomal degradation of Msg5, the dual-specificity protein phosphatase (DSP) that downregulates Slt2 in basal conditions. Surprisingly, proteolysis of this DSP did not require the Slt2 catalytic activity, which suggests a possible role of Slt2 as a scaffold for the ubiquitin ligase that modifies Msg5 post-translationally. Accordingly, Slt2 did not retro-phosphorylate its MAPKKs in response to HU in contrast to that occurring under cell wall stress (Jimenez-Sanchez et al. 2007).

The CWI pathway detects metalloid-induced stress

Arsenic is one of the most significant potential environmental poison and a big threat to human health. Therefore, yeast has been used in order to gain insight into the cellular responses that the two main forms of this metalloid, as trivalent arsenite [As(III)] and pentavalent arsenate [As(V)], induce in this model system. The CWI pathway activates in response to both arsenate (Matia-Gonzalez and Rodriguez-Gabriel 2011) and arsenite (Ahmadpour et al. 2016). Interestingly, Slt2 promotes arsenite expulsion via the aquaglyceroporin Fps1 (Ahmadpour et al. 2016).

The CWI route senses TORC1 inhibition

Nutrient signaling drives anabolic and growth-related processes through TORC1 activation. The inhibition of TORC1, either by rapamycin exposure or nutrient starvation, induces a quiescent state of yeast cells. In these conditions, the PKC pathway is essential for cell viability (Krause and Gray 2002; Torres et al. 2002). Rapamycin has diverse effects, including actin cytoskeleton disorganization, activation of the MAPK Slt2, and remodeling of the cell wall, making cells more resistant to cell wall stresses, such as zymolyase (Krause and Gray 2002; Torres et al. 2002). The picture depicting the outputs of rapamycin-induced Slt2 phosphorylation is far from complete, but at least includes two targets. The first one is the phosphorylation of Bcy1, the regulatory subunit of the protein kinase A (PKA). PKA is involved in the regulation of growth-related processes, and phosphorylation of Bcy1 promotes its inhibition (Soulard et al. 2010). The second one is the Slt2-mediated phosphorylation of the CDK inhibitor Sic1, leading to its stabilization and the promotion of G1 arrest (Moreno-Torres et al. 2015). Therefore, by monitoring TORC1 activity, the CWI pathway coordinates nutrient availability with growth and cell cycle progression.

Caffeine treatment also activates the CWI pathway (Martín et al. 2000) and it seems that this compound acts through TORC1 inhibition (Kuranda et al. 2006). Neither Wsc1 nor Mid2 mediate caffeine-triggered CWI signaling. However, some kind of cell wall damage is likely to occur under treatment with this drug, since sorbitol rescued caffeine sensitivity of mutants affected in the CWI pathway. Osmotic stabilization also prevented caffeine-induced Slt2 phosphorylation (Martín et al. 2000). Interestingly, caffeine led to phosphorylation of the Slt2 C-terminal extension at Ser423 and Ser428. As indicated above, this phosphorylation was dependent on the DNA damage checkpoint kinases, Mec1/Tel1 and Rad53, and specifically prevented Slt2 association with Swi4 and therefore blocked SBF activation (Truman et al. 2009). Moreover, uncoupling between Slt2 phosphorylation and Rlm1-dependent transcriptional induction has been described in cells treated with caffeine (Kuranda et al. 2006).

Is the actin cytoskeleton alteration the signal that triggers the CWI pathway activation under some stresses?

The treatment of yeast cells with the actin-depolymerizing drug latrunculin B leads to Slt2 activation. Mutants affected in transmission through the CWI MAPK module became binucleate without forming buds when exposed to this drug since this pathway is necessary for the morphogenesis checkpoint responsible for arresting cells in G2 when they are unable to bud because of the latrunculin B treatment (Harrison

et al. 2001). Moreover, the CWI pathway MAPK module is also necessary for the actin repolarization (Delley and Hall 1999) that follows the transient depolarization caused by different Slt2-activating conditions, such as heat or oxidative stress (Table 1). Whether activation of the CWI pathway under these stresses is a consequence of the actin cytoskeleton alteration or not remains to be discerned in most cases. Prevention of Slt2 activation by osmotic stabilization can be considered an indicator of a primary cell wall defect. For example, in the case of rapamycin treatment, sorbitol prevents both activation of the pathway and actin depolymerization, placing the origin of the stress at the cell wall (Krause and Gray 2002; Torres et al. 2002). In contrast, acid pH promotes actin depolarization and Slt2 activation, but these effects are not remedied by sorbitol (Claret et al. 2005). Furthermore, latrunculin-driven Slt2 activation does not seem to depend on Wsc or Mid2 cell wall sensors (Harrison et al. 2001), leaving the question open.

Activation of the CWI pathway in non-*Saccharomyces* fungi

The CWI pathway is mostly conserved in different fungal species and it is central for them to sense and respond to stimuli that directly stress the fungal cell surface, such as Congo red or echinocandins (González-Rubio et al. 2019; Dichtl et al. 2016). However, as occurring in *S. cerevisiae*, this signaling route also responds to stresses not directly related to the cell wall, like alkaline pH, caffeine, or heat shock in other fungi (Dichtl et al. 2016). In the case of the pathogen *Candida albicans*, the MAPK of the CWI pathway, Mkc1, is phosphorylated in response to oxidative and osmotic stress, calcium ions, and low-temperature shocks. In addition to cell wall biogenesis, it regulates morphogenesis and biofilm formation (Monge et al. 2006). Importantly, the CWI pathway is crucial for virulence and for intrinsic adaptation to stress induced by antifungals, not only in *C. albicans* but also in other human pathogenic fungi, such as *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, and *Cryptococcus neoformans* (Dichtl et al. 2016). Therefore, the research in these pathogenic fungi and the possibility of finding inhibitory drugs of this pathway would keep benefiting from findings in budding yeast.

The analogous pathway of the non-pathogenic model yeast *Schizosaccharomyces pombe*, named CIP (cell integrity pathway), is also activated in response to oxidative stress, glucose deprivation, as well as hypertonic and hypotonic stresses (Pérez and Cansado 2010). This pathway participates in ion homeostasis and vacuole fusion but its biological significance in the regulation of cell wall biosynthesis is not clearly defined yet, in spite of its activation by cell wall stress (Pérez et al. 2018). Thus, the CWI pathway seems to be a very flexible cellular tool to orchestrate the response to distinct stresses in fungi.

Concluding remarks and perspectives

The CWI pathway is best characterized in *S. cerevisiae* than in other fungi. In almost 30 years since the identification of the first core components of the CWI pathway, Pkc1 and Slt2, the involvement of this signaling pathway in the cell wall stress response has been deeply studied and characterized (Levin 2011). However, apart from cell-wall altering drugs and enzymatic complexes, many other chemical and physical agents have been found to activate this pathway, which is essential for yeast cells to defend from these conditions. However, the nature of the stress faced by the yeast cell in these situations is frequently not well defined, hampering the analysis of the physiological role of the CWI pathway. For example, acetic acid perturbs the plasma membrane (Guerreiro et al. 2016) (Table 1), but it also induces accumulation of ROS and therefore promotes oxidative stress (Guaragnella et al. 2007). In other cases, compounds with opposite properties, such as the oxidant H_2O_2 and the antioxidant quercetin, activate the CWI pathway (Vilaça et al. 2012) (Table 1). Other drawbacks to knowing the stimulation mechanism come from the fact that sometimes osmotic stabilization prevents both the sensitivity of mutants affected in the pathway and the activation of Slt2 induced by a given compound, suggesting that it is somehow damaging the cell wall, although its effect on this structure is not evident. Plasma membrane stress is not easily distinguishable to cell wall stress since these structures are intimately related and alteration of any of these structures generally gives rise to actin depolarization. Other CWI-activating stresses are not related to cell surface disturbances neither mediated by upstream components of the pathway but generate intracellular inputs, namely the genotoxic stress (Liu and Levin 2018). Furthermore, the different timing of the activation triggered by compounds altering the same cellular target also reflects the complexity of the sensing process. For example, both hypo-osmotic shock and high temperature provoke plasma membrane stress but, while the former triggers a very fast and transient response of the CWI pathway (Kamada et al. 1995; Davenport et al. 1995), the later induces a slower and sustained activation (Martin et al. 2000).

Altogether these findings evidence that the CWI pathway responds to a diverse array of both intra and extracellular inputs (Fig. 1). Not only the numerous stimuli but also the different outputs of this pathway provide an excellent platform to study the diverse molecular mechanisms that allow signal sensing, integration, dissemination, and specificity in MAPK signaling. Future challenges include the discernment of the nature of the signals detected by the pathway, the elucidation of the different CWI pathway-related protein complexes assembled according to the signal, and the attainment of a complete map of cellular targets regulated in each response.

Funding information This research was funded by grants BIO2016-75030-P (Ministerio de Economía y Competitividad), and S2017/BMD-3691-InGEMICS-CM (Comunidad de Madrid and European Structural and Investment Funds). E.J-G was supported by a predoctoral contract from the Universidad Complutense de Madrid, E.A-C by a contract from the Community of Madrid and co-financed by the European Social Fund within the Youth Employment Operative Program and the Youth Employment Initiative (YEI), and A.S-M by a predoctoral contract from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades of Spain.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.


References

- Ahmadpour D, Maciaszczyk-Dziubinska E, Babazadeh R, Dahal S, Migocka M, Andersson M, Wysocki R, Tamas MJ, Hohmann S (2016) The mitogen-activated protein kinase Slr2 modulates arsenite transport through the aquaglyceroporin Fps1. *FEBS Lett* 590:3649–3659. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12390>
- Albuquerque CP, Smolka MB, Payne SH, Bafna V, Eng J, Zhou H (2008) A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 7:1389–1396. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700468-MCP200>
- Alic N, Higgins VJ, Pichova A, Breitenbach M, Dawes IW (2003) Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278:41849–41855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307760200>
- Alonso-Rodríguez E, Fernández-Pinar P, Sacristán-Reviriego A, Molina M, Martín H (2016) An analog-sensitive version of the protein kinase Slr2 allows identification of novel targets of the yeast cell wall integrity pathway. *J Biol Chem* 291:5461–5472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683680>
- Babele PK, Thakre PK, Kumawat R, Tomar RS (2018) Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* 213:65–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.028>
- Babour A, Bicknell AA, Tourtellotte J, Niwa M (2010) A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* 142:256–269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.006>
- Bandyopadhyay S, Mehta M, Kuo D, Sung MK, Chuang R, Jaehnig EJ, Bodenmiller B, Licon K, Copeland W, Shales M, Fiedler D, Dutkowski J, Guenole A, van Attikum H, Shokat KM, Kolodner RD, Huh WK, Aebersold R, Keogh MC, Krogan NJ, Ideker T (2010) Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science* 330:1385–1389. <https://doi.org/10.1126/science.1195618>
- Baranwal S, Azad GK, Singh V, Tomar RS (2014) Signaling of chloroquine-induced stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* requires the Hog1 and Slr2 mitogen-activated protein kinase pathways. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5552–5566. <https://doi.org/10.1128/AAC.02393-13>
- Bicknell AA, Tourtellotte J, Niwa M (2010) Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *J Biol Chem* 285:17545–17555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.084681>
- Bonilla M, Cunningham KW (2003) Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* 14:4296–4305. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0113>
- Bryan BA, Knapp GS, Bowen LM, Polymenis M (2004) The UV response in *Saccharomyces cerevisiae* involves the mitogen-activated protein kinase Slr2p. *Curr Microbiol* 49:32–34. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4259-2>
- Casagrande V, Del V, Militti C, Mangiapelo E, Frontali L, Negri R, Bianchi MM (2009) Cesium chloride sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: an interplay among the HOG and CWI MAPK pathways and the transcription factor Yaf9. *FEMS Yeast Res* 9:400–410. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00486.x>
- Chen RE, Thorner J (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1773:1311–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.05.003>
- Chen Y, Feldman DE, Deng C, Brown JA, De Giacomo AF, Gaw AF, Shi G, Le QT, Brown JM, Koong AC (2005) Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cancer Res* 3:669–677. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0181>
- Claret S, Gatti X, Doignon F, Thoraval D, Crouzet M (2005) The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4:1375–1386. <https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1375-1386.2005>
- Cooper KF, Khakhina S, Kim SK, Strich R (2014) Stress-induced nuclear-to-cytoplasmic translocation of cyclin C promotes mitochondrial fission in yeast. *Dev Cell* 28:161–173. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.009>
- Corcoles-Saez I, Ballester-Tomas L, De La Torre-Ruiz MA, Prieto JA, Rande-Gil F (2012) Low temperature highlights the functional role of the cell wall integrity pathway in the regulation of growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 446:477–488. <https://doi.org/10.1042/BJ20120634>
- Dardalhon M, Agoutin B, Watzinger M, Averbeck D (2009) Slr2 (Mpk1) MAP kinase is involved in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 8-methoxypsoralen plus UVA. *J Photochem Photobiol B* 95:148–155. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.02.001>
- Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE, Gustin MC (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* 270:30157–30161. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.50.30157>
- Delarue M, Poterewicz G, Hoxha O, Choi J, Yoo W, Kayser J, Holt L, Hallatschek O (2017) SCWISH network is essential for survival under mechanical pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:13465–13470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711204114>
- Delley PA, Hall MN (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* 147:163–174. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.163>
- Dichtl K, Samantaray S, Wagener J (2016) Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cell Microbiol* 18(9):1228–1238. <https://doi.org/10.1111/cmi.12612>
- Dupres V, Alsteens D, Wilk S, Hansen B, Heinisch JJ, Dufrene YF (2009) The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nat Chem Biol* 5:857–862. <https://doi.org/10.1038/nchembio.220>
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B, Arkin AP, Astromoff A, el Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Güldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kötter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzler EA, Yang

- Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418:387–391. <https://doi.org/10.1038/nature00935>
- Golla U, Joseph D, Tomar RS (2016) Combined transcriptomics and chemical-genetics reveal molecular mode of action of valproic acid, an anticancer molecule using budding yeast model. *Sci Rep* 6: 35322. <https://doi.org/10.1038/srep35322>
- González-Rubio G, Fernández-Acero T, Martín H, Molina M (2019) Mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in fungal signaling: conservation, function, and regulation. *Int J Mol Sci* 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071709>
- Gray JV, Ogas JP, Kamada Y, Stone M, Levin DE, Herskowitz I (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J* 16:4924–4937. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4924>
- Guaragnella N, Antonacci L, Passarella S, Marra E, Giannattasio S (2007) Hydrogen peroxide and superoxide anion production during acetic acid-induced yeast programmed cell death. *Folia Microbiol (Praha)* 52:237–240
- Guerreiro JF, Muir A, Ramachandran S, Thomer J, Sa-Correia I (2016) Sphingolipid biosynthesis upregulation by TOR complex 2-Ypk1 signaling during yeast adaptive response to acetic acid stress. *Biochem J* 473:4311–4325. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160565>
- Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28:739–745. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.015>
- Harrison JC, Bardes ES, Ohya Y, Lew DJ (2001) A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* 3:417–420. <https://doi.org/10.1038/35070104>
- Harrison JC, Zyla TR, Bardes ES, Lew DJ (2004) Stress-specific activation mechanisms for the “cell integrity” MAPK pathway. *J Biol Chem* 279:2616–2622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306110200>
- Hatakeyama R, Kono K, Yoshida S (2017) Ypk1 and Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodeling after membrane stresses. *J Cell Sci* 130:1169–1178. <https://doi.org/10.1242/jcs.198382>
- Heinisch JJ, Rodicio R (2018) Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol Rev* 42:4562651. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux051>
- Hohmann S (2015) An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet* 61:373–382. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0>
- Islahudin F, Khozoe C, Bates S, Ting KN, Pleass RJ, Avery SV (2013) Cell wall perturbation sensitizes fungi to the antimalarial drug chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3889–3896. <https://doi.org/10.1128/AAC.00478-13>
- Jendretzki A, Wittland J, Wilk S, Straede A, Heinisch JJ (2011) How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur J Cell Biol* 90:740–744. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.04.006>
- Jimenez-Sanchez M, Cid VJ, Molina M (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* 282:31174–31185. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706270200>
- Jin C, Parshin AV, Daly I, Strich R, Cooper KF (2013) The cell wall sensors Mtl1, Wsc1, and Mid2 are required for stress-induced nuclear to cytoplasmic translocation of cyclin C and programmed cell death in yeast. *Oxidative Med Cell Longev* 2013:320823–320815. <https://doi.org/10.1155/2013/320823>
- Jin C, Strich R, Cooper KF (2014) Slit2p phosphorylation induces cyclin C nuclear-to-cytoplasmic translocation in response to oxidative stress. *Mol Biol Cell* 25:1396–1407. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0550>
- Jin C, Kim SK, Willis SD, Cooper KF (2015) The MAPKKs Ste11 and Bck1 jointly transduce the high oxidative stress signal through the cell wall integrity MAP kinase pathway. *Microb Cell* 2:329–342. <https://doi.org/10.15698/mic2015.09.226>
- Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9:1559–1571. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1559>
- Ketela T, Green R, Bussey H (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* 181:3330–3340
- Krasley E, Cooper KF, Mallory MJ, Dunbrack R, Strich R (2006) Regulation of the oxidative stress response through Slit2p-dependent destruction of cyclin C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 172: 1477–1486. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.052266>
- Krause SA, Gray JV (2002) The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12: 588–593
- Krause SA, Cundell MJ, Poon PP, McGhie J, Johnston GC, Price C, Gray JV (2012) Functional specialisation of yeast Rho1 GTP exchange factors. *J Cell Sci* 125:2721–2731. <https://doi.org/10.1242/jcs.100685>
- Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palamarczyk G, François J (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* 61:1147–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05300.x>
- Kwon Y, Chiang J, Tran G, Giaever G, Nislow C, Hahn BS, Kwak YS, Koo JC (2016) Signaling pathways coordinating the alkaline pH response confer resistance to the hevein-type plant antimicrobial peptide Pn-AMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta* 244:1229–1240. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2579-2>
- Leduc A, He CH, Ramotar D (2003) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* cell-wall pathway gene SLG1 causes hypersensitivity to the antitumor drug bleomycin. *Mol Gen Genomics* 269:78–89. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0812-8>
- Levin DE (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189: 1145–1175. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>
- Liu L, Levin DE (2018) Intracellular mechanism by which genotoxic stress activates yeast SAPK Mpk1. *Mol Biol Cell* 29:2898–2909
- Martin H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C, Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slit2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275:1511–1519. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1511>
- Matia-Gonzalez AM, Rodriguez-Gabriel MA (2011) Slit2 MAPK pathway is essential for cell integrity in the presence of arsenate. *Yeast* 28:9–17. <https://doi.org/10.1002/yea.1816>
- Mensonides FI, Brul S, Klis FM, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ (2005) Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl Environ Microbiol* 71:4531–4538. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4531-4538.2005>
- Mishra R, van Drogen F, Dechant R, Oh S, Jeon NL, Lee SS, Peter M (2017) Protein kinase C and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:13471–13476. <https://doi.org/10.1073/pnas.1709079114>
- Mizuno T, Nakamura M, Irie K (2018) Induction of Ptp2 and Cmp2 protein phosphatases is crucial for the adaptive response to ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 8:13078–31413. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31413-6>
- Mollapour M, Piper PW (2006) Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6:1274–1280. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00118.x>
- Mollapour M, Shepherd A, Piper PW (2009) Presence of the Fps1p aquaglyceroporin channel is essential for Hog1p activation, but suppresses Slit2(Mpk1)p activation, with acetic acid stress of yeast. *Microbiology* 155:3304–3311. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030502-0>

- Monge RA, Román E, Nombela C, Pla J (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. Microbiology 152:905–912. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28616-0>
- Moreno-Torres M, Jaquenoud M, De Virgilio C (2015) TORC1 controls G1-S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. Nat Commun 6:8256. <https://doi.org/10.1038/ncomms9256>
- Mori K (2015) The unfolded protein response: the dawn of a new field. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci 91:469–480. <https://doi.org/10.2183/pjab.91.469>
- Morrison DK (2012) MAP kinase pathways. Cold Spring Harb Perspect Biol 4:4–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Nomura W, Inoue Y (2015) Methylglyoxal activates the target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 35:1269–1280. <https://doi.org/10.1128/ECB.01118-14>
- Pérez P, Cansado J (2010) Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. Curr Protein Pept Sci 11:680–692
- Pérez P, Cortés J, Cansado J, Ribas JC (2018) Fission yeast cell wall biosynthesis and cell integrity signalling. Cell Surf 4:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.10.001>
- Petkova MI, Pujol-Carrion N, Arroyo J, Garcia-Cantalejo J, Angeles de la Torre-Ruiz M (2010) Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. J Biol Chem 285:19521–19531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085282>
- Piña F, Yagisawa F, Obara K, Gregerson JD, Kihara A, Niwa M (2018) Sphingolipids activate the endoplasmic reticulum stress surveillance pathway. J Cell Biol 217:495–505. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708068>
- Queralt E, Igual JC (2005) Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 171:1485–1498. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.045005>
- Rajavel M, Philip B, Buehrer BM, Errede B, Levin DE (1999) Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 19:3969–3976. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.6.3969>
- Rousseau A, Bertolotti A (2016) An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. Nature 536:184–189. <https://doi.org/10.1038/nature18943>
- Sanz AB, Garcia R, Rodriguez-Pena JM, Arroyo J (2017) The CWI pathway: regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast. J Fungi (Basel) 4:jof4010001. <https://doi.org/10.3390/jof4010001>
- Scrimale T, Didone L, Mesy Bentley KL, Krysan DJ (2009) The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell 20:164–175. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0809>
- Serra-Cardona A, Canadell D, Arino J (2015) Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast. Microb Cell 2:182–196. <https://doi.org/10.15698/mic2015.06.205>
- Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. Nature 319:689–693. <https://doi.org/10.1038/319689a0>
- Serrano R, Bernal D, Simon E, Arino J (2004) Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. J Biol Chem 279:19698–19704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313746200>
- Serrano R, Martin H, Casamayor A, Arino J (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slf2 MAPK pathway. J Biol Chem 281:39785–39795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604497200>
- Soriano-Carot M, Bano MC, Igual JC (2012) The yeast mitogen-activated protein kinase Slf2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. Cell Div 7:1. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-1>
- Soriano-Carot M, Quilis I, Bano MC, Igual JC (2014) Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. Nucleic Acids Res 42:7084–7095. <https://doi.org/10.1093/nar/gku373>
- Soulard A, Cremonesi A, Moes S, Schutz F, Jenö P, Hall MN (2010) The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. Mol Biol Cell 21:3475–3486. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0182>
- Staleva L, Hall A, Orlov SJ (2004) Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent manner. Mol Biol Cell 15:5574–5582. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0142>
- Straede A, Corran A, Bundy J, Heinisch JJ (2007) The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. Yeast 24:321–334. <https://doi.org/10.1002/yea.1478>
- Torres L, Martin H, Garcia-Saez MI, Arroyo J, Molina M, Sanchez M, Nombela C (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* lyt2 mutants. Mol Microbiol 5:2845–2854
- Torres J, Di Como CJ, Herrero E, De La Torre-Ruiz MA (2002) Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. J Biol Chem 277:43495–43504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205408200>
- Torres-Quiroz F, Garcia-Marques S, Coria R, Rande-Gil F, Prieto JA (2010) The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. J Biol Chem 285:20088–20096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063578>
- Truman AW, Kim KY, Levin DE (2009) Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. Mol Cell Biol 29:6449–6461. <https://doi.org/10.1128/ECB.00794-09>
- Udom N, Chansongkrow P, Charoensawan V, Auesukaree C (2019) Coordination of the cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Environ Microbiol AEM-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.00551-19>
- Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A 94:13804–13809. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13804>
- Vilaça R, Mendes V, Mendes MV, Carreto L, Amorim MA, de Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N, Costa V (2012) Quercetin protects *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative stress by inducing trehalose biosynthesis and the cell wall integrity pathway. PLoS One 7:e45494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045494>
- Vilella F, Herrero E, Torres J, De La Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. J Biol Chem 280:9149–9159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411062200>
- Willis SD, Stieg DC, Ong KL, Shah R, Strich AK, Grose JH, Cooper KF (2018) Snf1 cooperates with the CWI MAPK pathway to mediate the degradation of Med13 following oxidative stress. Microb Cell 5:357–370. <https://doi.org/10.15698/mic2018.08.641>
- Xiong B, Zhang L, Xu H, Yang Y, Jiang L (2015) Cadmium induces the activation of cell wall integrity pathway in budding yeast. Chem Biol Interact 240:316–323. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.007>
- Zu T, Verna J, Ballester R (2001) Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Gen Genomics 266:142–155

Rewiring the yeast cell wall integrity (CWI) pathway through a synthetic positive feedback circuit unveils a novel role for the MAPKKK Ssk2 in CWI pathway activation

Elena Jiménez-Gutiérrez, Estíbaliz Alegría-Carrasco, Esmeralda Alonso-Rodríguez, Teresa Fernández-Acero, María Molina and Humberto Martín 

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Universidad Complutense de Madrid, Spain

Keywords

cell wall integrity; MAPK; phosphorylation; positive feedback loop; yeast

*Correspondence

M. Molina and H. Martín, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040-Madrid, Spain

Tel: +34 913941888

E-mails: molmifa@ucm.es (MM);

humberto@ucm.es (HM)

(Received 22 November 2019, revised 17 February 2020, accepted 6 March 2020)

doi:10.1111/febs.15288

The cell wall integrity (CWI) pathway mediates the response of *Saccharomyces cerevisiae* to cell wall alterations. Stress at the cell surface is detected by mechanosensors, which transduce the signal to a protein kinase cascade that involves Pkc1, Bck1, Mkk1/Mkk2, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) Slt2 and the transcription factor Rlm1. We incorporated a positive feedback loop into this pathway by placing a hyperactive *MKK1* allele under the control of the Rlm1-regulated *MLP1* promoter. This circuit operates as a signal amplifier and leads to a highly increased Slt2 activation under stimulating conditions. Triggering the CWI pathway in cells engineered with this circuit, which we have named the Integrity Pathway Activation Circuit (IPAC), results in strong growth inhibition. Exploitation of this hypersensitive phenotype allowed the identification of novel proteins that contribute in signalling to Rlm1 in response to cell surface stressing agents such as Congo red, zymolyase and SDS. Among these proteins, the MAPK kinase kinase Ssk2 of the osmoregulatory high-osmolarity glycerol (HOG) pathway, but not its paralogue Ssk22, proved to be necessary for the SDS-induced IPAC-mediated growth inhibition. We found the existence of an Ssk1-independent Ssk2-Pbs2-Hog1-CWI pathway signalling axis that contributes to Slt2 activation in response to cell surface stress. We also demonstrated that the MAP kinase kinases Mkk1 and Pbs2 and the MAPKs Slt2 and Hog1 of the HOG and CWI pathways interact physically, forming a complex. Our results show how a simple synthetic circuit can be used as a powerful tool for a better understanding of signalling pathways.

Introduction

Eukaryotic cells rely on mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways to mediate the response to a wide array of extracellular stimuli. Therefore, these routes regulate key cell fate decisions such as growth,

differentiation or survival in response to stress [1]. They are very versatile signalling tools and contain a three-tiered protein kinase cascade comprising a MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), a MAP kinase

Abbreviations

CWI, cell wall integrity; HOG, high-osmolarity glycerol; IPAC, Integrity Pathway Activation Circuit; MAPK, mitogen-activated protein kinase; OD, optical density; SD, synthetic dextrose; SDS, sodium dodecyl sulphate; SG, synthetic galactose; SR, synthetic raffinose; YPD, yeast extract–bacto-peptone–dextrose.

kinase (MAPKK) and a MAP kinase (MAPK), which are activated by sequential phosphorylation upon pathway stimulation. This multilayered structure provides a great flexibility of system response and allows signal amplification, multiple points of regulation, noise tolerance and the generation of switch-like responses [2].

The model yeast *Saccharomyces cerevisiae* has five MAPK pathways involved in mating, filamentous and invasive growth, spore wall assembly, osmoregulation and cell wall integrity (CWI) maintenance [2]. The CWI pathway is essential for cells to survive under cell wall stress conditions by triggering a salvage mechanism to strengthen this vital structure. This pathway is stimulated through a family of cell surface mechanosensors coupled to the Rho1 GTPase, which activates Pkc1, which in turn activates the CWI MAPK module, composed of the MAPKKK Bck1, the MAPKKs Mkk1 and Mkk2, and the MAPK Slt2 [3]. Slt2 phosphorylates the MADS-box transcription factor Rlm1 [4], which induces the expression of cell wall maintenance proteins including the Slt2 paralogue Mlp1 [5]. The CWI pathway is also activated by heat stress, hypo-osmotic shock, oxidative stress, high and low pH, pheromones or DNA-damaging agents, indicating its involvement in the response to stresses and cellular processes not directly related to the cell wall [6].

The high-osmolarity glycerol (HOG) pathway maintains osmotic equilibrium under hyperosmotic stress [7]. This pathway is composed of two branches [8,9]. The first branch includes the transmembrane protein Sho1, the osmosensors Hkr1 and Msb2, and the membrane anchor protein Opy2, which transmit the signal to the MAPKKK Ste11 through the GTPase Cdc42, the adaptor protein Ste50 and the protein kinase Ste20 [9]. The second branch is initiated by the osmosensor histidine kinase Sln1, which signals through the phosphotransfer protein Ypd1 to the response regulator Ssk1, which activates the redundant MAPKKs Ssk2 and Ssk22. The two branches converge in the phosphorylation of MAPKK Pbs2 by the corresponding MAPKKs. Therefore, the activation of any of these branches triggers the Pbs2-mediated phosphorylation of the MAPK Hog1 and its nuclear internalisation by the karyopherin-beta importin homologue Nmd5 [10]. Nuclear phosphorylated and thereby activated Hog1 phosphorylates several transcription factors to regulate the expression of genes involved in intracellular glycerol accumulation [11].

The CWI and HOG pathways do not operate in an isolated manner. The existence of crosstalk between them has been found in different conditions. The

activation of Slt2 observed in response to hyperosmotic shock occurs in a HOG-dependent manner [12]. Moreover, Slt2 activation induced by the cell wall-damaging enzymatic complex zymolyase requires the participation of the Sho1 branch of the HOG pathway [13]. The interaction between Ste11 and Mkk1/2 through the protein Nst1 has been also reported [14]. In addition, some components of these pathways, apart from transmitting the signal to downstream elements, may play important roles in other processes, such as actin cytoskeleton organisation and cell polarity. For example, heat stress promotes the transient and reversible disassembly of the actin cytoskeleton. Pkc1, but not the downstream CWI MAPK cascade, is necessary for actin repolarisation [15]. After local cell wall damage, Pkc1 disperses polarity factors from the bud to wound sites through the induction of the formin Bni1 degradation [16]. Following osmotic stress, the MAPKKK Ssk2 mediates recovery of the actin cytoskeleton by forming a complex with actin, which requires the polarisome proteins Bud6 and Pea2, and the formin Bni1 [17].

Since the duration, timing and intensity of signalling through MAPK pathways are essential to produce the correct physiological output, loss of regulation of MAPK activity in mammalian cells is implicated in cancer and many other diseases [18]. In yeast, either the lack of CWI signalling in the presence of stress or the hyperactivation of the pathway leads to lethality [19]. Therefore, multiple fundamental mechanisms have evolved to achieve a precise modulation of these routes, including positive and negative feedback loops [20]. Whereas adaptation and noise resistance are typically brought by negative feedback mechanisms, positive feedback loops provide amplification, change the timing of the response and also trigger a bistable switch [21].

Their complexity and the importance in assuring cell survival under stress conditions make MAPK pathways very interesting targets for synthetic approaches. In addition, yeast is a very attractive model organism for these studies, since it has many valuable traits for synthetic biology [22]. For these reasons, a significant number of synthetic biology strategies have been applied to MAPK pathways in yeast, allowing a deeper understanding of signalling design principles [23]. In particular, synthetic feedback loops have been integrated within the mating pathway to provide several different behaviours, including bistability [24]. Here, we explore the consequences of introducing a synthetic positive feedback loop in the CWI pathway. Switching on this loop through the stimulation of the pathway leads to cellular lethality. We demonstrate the

potential of this genetic circuit as a tool for uncovering novel regulatory components of signalling through the CWI pathway.

Results

Rewiring the Slt2 MAPK module through a synthetic positive feedback circuit

To construct a positive feedback circuit that operates in the CWI pathway, the constitutively active *MKK1*^{S386P} allele [25] was placed between the *MLP1* (*KDX1/YKL161C*) promoter, which is strongly induced following stimulation of this pathway [5], and the *ADHI* transcriptional terminator in a centromeric plasmid. In wild-type cells transformed with this plasmid, under stimulating conditions, the Rlm1-mediated induction of the *MLP1* promoter should give rise to a high amount of Mkk1^{S386P}, which would further phosphorylate and activate Slt2, providing activation of the feedback mechanism and resulting in continuous signal amplification (Fig. 1A).

We tested the impact of this circuit on signalling through the CWI pathway by analysing *MLP1* expression as readout. To this end, we determined β -galactosidase activity from a *MLP1-lacZ* reporter in cells carrying the genetic circuit in a centromeric plasmid versus those transformed with the empty vector, in response to concentrations ranging from 1 to 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of the cell wall stressing agent Congo red for 4 h. In the absence of the circuit, successive increases in Congo red concentration resulted in increases in β -galactosidase levels of fourfold (1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 25-fold (5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 110-fold (30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and 95-fold (180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; Fig. 1B), indicating a saturated response from a concentration of 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The presence of the feedback circuit clearly increased the β -galactosidase values in relation to cells bearing the empty vector, with the highest amplification at 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of Congo red (~ 4 -fold). We also determined the impact of this genetic circuit on the dual phosphorylation, and therefore activation, kinetics of the MAPK Slt2 in response to the treatment with low, medium and high Congo red concentration for up to 8 h. As observed in Fig. 1C, at the lowest Congo red concentration the amount of activated Slt2 peaked at 8 h; at higher concentrations, Slt2 phosphorylation reached the maximum level at shorter times, between 2 and 4 h. In cells without the circuit, maximum activation ranged from twofold following treatment with 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ to eightfold with 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. In all cases, the circuit significantly increased the amount of phosphorylated Slt2 (Fig. 1C). At 180 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, an increase of 16-fold over the basal phosphorylation in

cells lacking the circuit at time 0 was observed. These results indicate that the genetic loop is indeed functional in promoting a high and sustained signalling flow through the CWI pathway. Thus, we named this circuit 'IPAC' standing for 'Integrity Pathway Activation Circuit'.

We next explored the effect of this circuit on signalling through the pathway in response to hypotonic shock, which induces a very rapid and transient activation of the CWI pathway [26]. As observed in Fig. 1D, IPAC-containing cells displayed similar Slt2 phosphorylation kinetics to cells lacking the circuit, peaking at 1 min, but with higher phospho-Slt2 levels at any time point. This result shows the rapidity of the IPAC in developing an amplified response and the maintenance of adaptation mechanisms to hypotonic shock in the IPAC-rewired CWI pathway. We then analysed the effect of eliminating the Mid2 sensor, which mediates most of the Congo red-induced CWI pathway activation [27]. Deletion of *MID2* significantly reduced *MLP1-lacZ* transcriptional activation in IPAC-containing cells after treatment with Congo red (Fig. 1E). However, whereas the presence of the IPAC doubled β -galactosidase levels upon Congo red treatment, the increase was sevenfold in *mid2* Δ mutants. These results suggest first that the IPAC-rewired CWI pathway keeps its sensitivity to regulators of the pathway and second that the capacity of the IPAC for increasing signalling is higher under conditions promoting low activation.

The positive feedback loop renders cells hypersensitive to CWI pathway activation

We next wondered whether the activation of the IPAC affected cell growth. As expected, the presence of agents that disturb the yeast cell surface, namely Congo red, SDS or zymolyase, prevented *slt2* Δ mutant cells from growing (Fig. 2A). These compounds also led to growth inhibition of IPAC-containing cells, although to a lesser extent as compared to the *SLT2* deletion. This inhibition was observed at concentrations that did not affect growth of wild-type cells. This result indicates that the IPAC enhances the sensitivity of yeast to cell wall stress and is consistent with the reported growth inhibition caused by *GALI*-driven overexpression of the hyperactive allele *MKK1*^{S386P} that is part of the circuit [25]. Caffeine was shown to activate the MAPK Slt2 but not the transcription factor Rlm1 [28]. As observed in Fig. 2A, this compound led to growth inhibition of *slt2* Δ but not IPAC-containing cells, confirming that there is no significant Rlm1-dependent *MLP1* gene

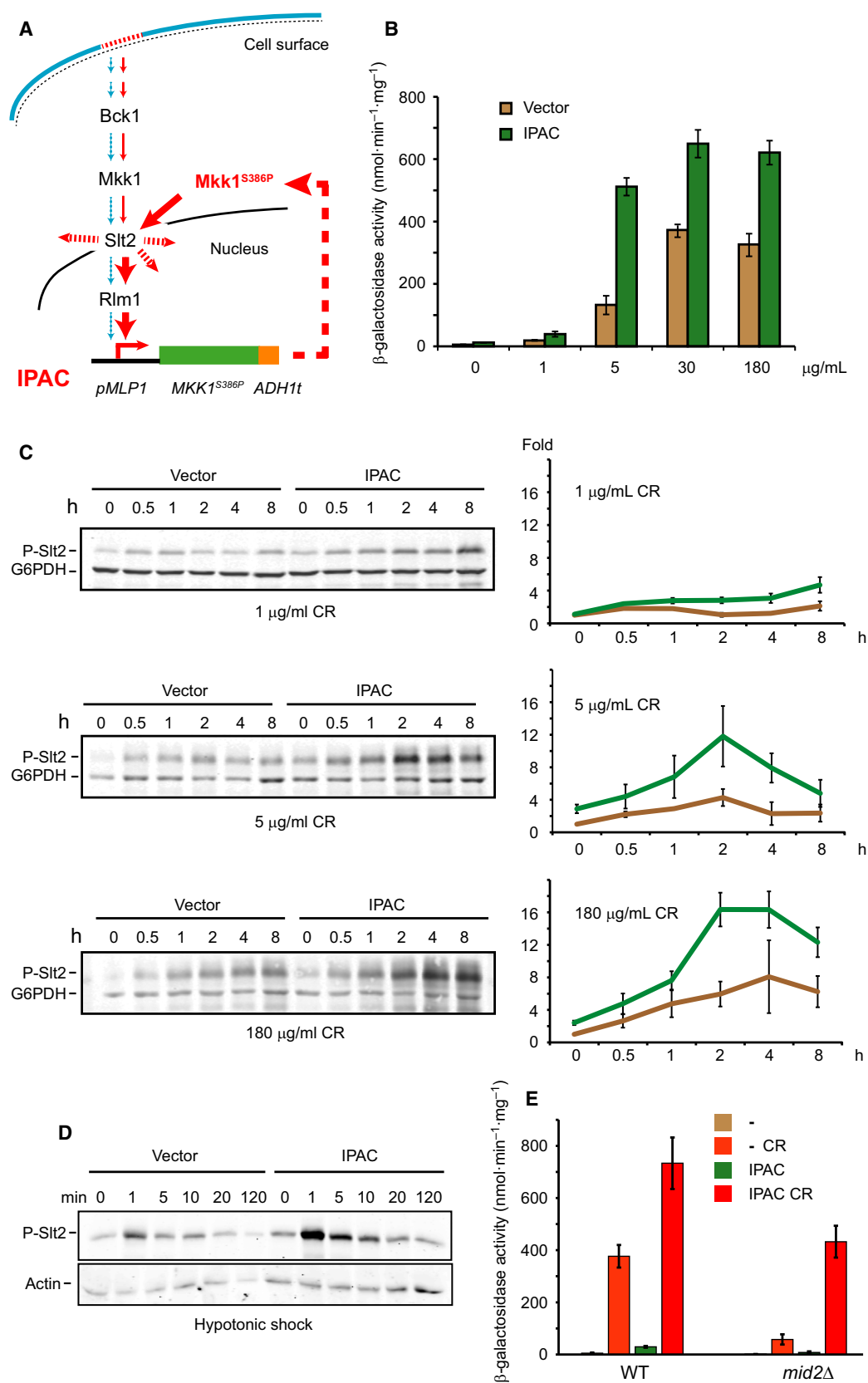


Fig. 1. The IPAC promotes hyperactivation of the CWI pathway following cell wall stress. (A) Scheme of the CWI pathway containing the IPAC. IPAC consists of the *MLP1* promoter, the hyperactive allele *MKK1*^{S386P} and the transcription termination sequence of *ADH1* (*ADH1t*). In the absence of stimulus, the pathway displays a low basal level of signalling (blue lines). Stimulation of the pathway (red lines) leads to Slt2 activation by dual phosphorylation, resulting in *MLP1* transcriptional induction via Rlm1 activation. *MLP1*-driven *MKK1*^{S386P} expression provokes an increase in Slt2 activation, generating a positive feedback loop and the hyperactivation of the CWI pathway. (B) Expression of *MLP1-lacZ*, determined as β -galactosidase activity from extracts of the strain BY4741 cotransformed with the plasmid p*MLP1-lacZ* and either the empty vector YCplac111 or YCplac111-IPAC. Cells were grown in YPD medium at 24 °C in the absence (–) or presence of the indicated concentrations of Congo red (CR) for 4 h. Data represent the average of β -galactosidase activity of three independent transformants. Error bars indicate standard deviation. (C) Western blotting analysis of extracts of the same BY4741 cells as in (B), cultured in YPD at 24 °C and treated with the indicated concentrations of CR for the indicated times (h). Dually phosphorylated Slt2 and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42 and anti-G6PDH antibodies, respectively. A representative blot is included. The graphics show the amount of phosphorylated Slt2, normalised with respect to the loading control for each sample and expressed as fold increase relative to the wild-type level (Vector) in the absence of stress. Data represent the average of three independent transformants. Error bars indicate standard deviation. (D) Western blotting analysis of extracts of BY4741 cells transformed with either the empty vector YCplac111 or YCplac111-IPAC. Aliquots of a single culture in YPD plus 1 M sorbitol were withdrawn before (0) and after the indicated times following resuspension in YPD. Dually phosphorylated Slt2 and actin (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42 and anti-actin antibodies, respectively. A representative blot from three different experiments is shown. (E) CR signalling in IPAC-containing cells is sensed and modulated similarly to wild-type cells. β -Galactosidase activity of cell extracts from BY4741 (WT) and the isogenic *mid2* Δ strains bearing the p*MLP1-lacZ* plasmid and YCplac111 (–) or YCplac111-IPAC. Cells were either left untreated (–) or treated for 4 h with 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CR. Data represent the average of β -galactosidase activity of three independent transformants. Error bars indicate standard deviation.

induction. The IPAC also strongly affected growth in liquid media containing cell wall-altering agents, as reflected by the reduction in the MIC (minimal inhibitory concentration) of zymolyase observed in IPAC-bearing cells when compared to cells lacking the circuit (Fig. 2B). Since Congo red-induced *MLP1* transcriptional induction is abolished in *rlm1* Δ cells [5], we wondered whether IPAC-containing

cells no longer showed Congo red sensitivity. This was the case, as observed by using a halo assay (Fig. 2C), proving that the IPAC-mediated sensitivity of yeast cells to CWI stimuli such as Congo red is dependent on the full functionality of this signalling circuit. These results also indicate that the IPAC is an excellent tool for analysing CWI pathway signalling through an easy growth assay.

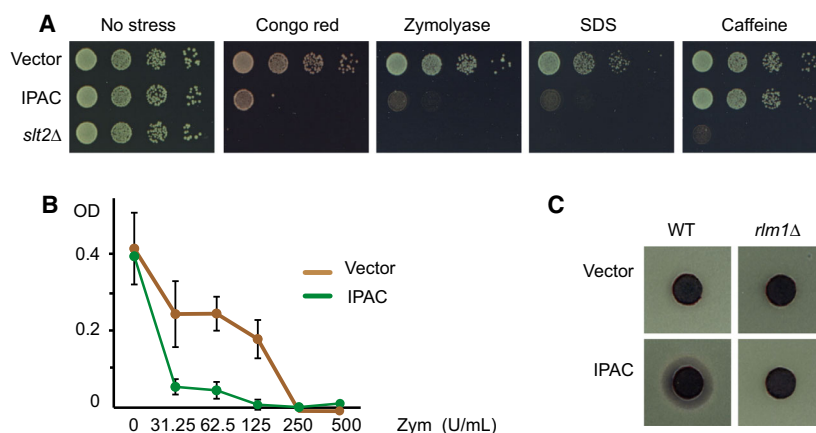


Fig. 2. Activation of the IPAC leads to growth inhibition. (A) Ten-fold serial dilutions of the BY4741 strain transformed with the empty vector YCplac111 or YCplac111-IPAC and the isogenic *slt2* Δ strain carrying YCplac111. Yeast cells were spotted onto SD Leu⁻ plates pH 6.5 in the absence (no stress) or presence of 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CR, 10 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ of zymolyase, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ SDS or 4 mM of caffeine and incubated at 30 °C for 48 h. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown. (B) Multiwell plate sensitivity assay of the BY4741 strain transformed with YCplac111 or YCplac111-IPAC to the indicated concentrations of zymolyase. Data represent the average value of three independent transformants. Error bars indicate standard deviation. (C) Growth inhibition halo assay on SD Leu⁻ plates of strains BY4741 or the isogenic Y00993 (*rlm1* Δ) strains transformed with YCplac111 or YCplac111-IPAC. Six-millimetre-diameter discs were impregnated with 20 μL of 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ CR. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

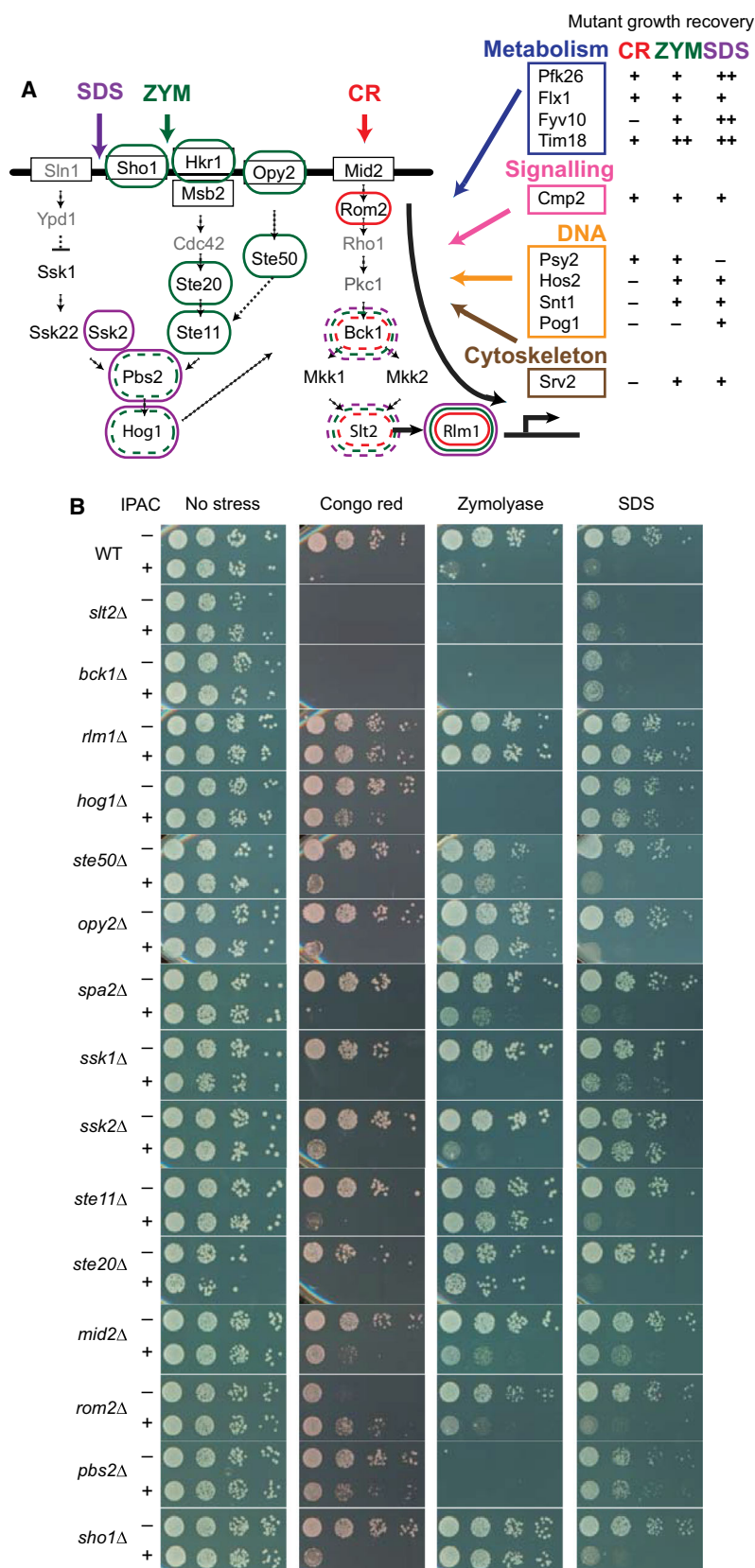


Fig. 3. Results of the screening of a subcollection of *Saccharomyces cerevisiae* mutants able to suppress the lethality of IPAC-engineered cells treated with CR, zymolyase and SDS. (A) Proteins of the HOG and CWI pathway surrounded by red, green and purple circles indicate that the corresponding mutants recovered growth under CR, zymolyase and SDS stress, respectively. Discontinuous circles indicate that the corresponding mutant without the IPAC was already sensitive to the stress. Mutants lacking proteins in grey were not analysed. Novel genes identified in the screening whose mutation was able to recover growth are indicated on the right. The scores for growth recovery under each stress are indicated, ranging from strong recovery (++) to no effect (-) according to spot assays shown in Fig. 4A. (B) Sensitivity of wild-type BY4741 and the indicated isogenic mutant strains bearing the vector pHR70 (-) or the plasmid pHR70-IPAC (+) to different stresses. Ten-fold serial dilutions of cell suspensions were spotted onto SD Ura⁻ pH 6.5 plates in the absence (no stress) or presence of 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CR, 10 U $\cdot\text{mL}^{-1}$ (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of zymolyase or 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS, and incubated at 30 °C for 48 h. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

IPAC-based identification of novel proteins that contribute to signalling through the CWI pathway

In view of the previous results, we considered IPAC an excellent tool to identify regulators of the CWI pathway. We reasoned that any mutation that promotes a significant reduction in signalling would restore growth of IPAC-containing cells under CWI stimulation. To evaluate this, a subcollection of 265 mutant strains deleted in genes related to signalling or apoptosis (Table S1) and transformed with the centromeric plasmid YCplac111-IPAC was screened for their ability to grow in the presence of low concentrations of Congo red, zymolyase or SDS (see [Materials and methods](#)). Forty of these mutants were selected on this basis, and 25 of them reproduced some growth recovery phenotype after *de novo* transformation with a different centromeric plasmid containing the IPAC. Ten mutants were affected in genes encoding potential novel CWI pathway regulators under cell wall stress (Figs 3A and 4A). The effect of these 10 mutations on CWI pathway signalling was analysed by using the *MLP1-lacZ*-based transcriptional reporter assay (Fig. 4B). The *rlm1Δ* and *hkr1Δ* mutants were also included as controls. Lack of Rlm1 resulted in the absence of *MLP1* induction in response to Congo red, zymolyase and SDS, whereas the absence of the HOG pathway osmosensor Hkr1 only blocked zymolyase induction, as expected according to its role in sensing this cell wall stressor [13]. It is interesting to note that four out of these 10 mutants lack metabolic enzymes, and another four are defective in proteins related to DNA function.

Among the 25 identified mutants, 15 were affected in signalling components already known to participate in MAPK signalling (Fig. 3A,B). A detailed analysis of the effect of these mutations on IPAC-induced growth inhibition provided interesting information about the signalling flow to Slt2 promoted by these stresses. The most interesting data came from observing growth of yeast mutants in the presence of SDS. The lack of the Rho1 GEF Rom2 did not recover growth of cells carrying the circuit under SDS stress, supporting the idea that, as with zymolyase, signalling to Slt2 in response to this stress does not go through the conventional path followed by other cell wall stresses. Deletion of *PBS2* and *HOG1* recovered growth of cells carrying the IPAC on SDS-containing media, also suggesting the involvement of the HOG pathway in signal transmission from the cell surface to the CWI pathway in response to this membrane insult (Fig. 3A, B). Most interestingly, and in contrast to that

occurring with zymolyase, deletion of *SSK2* but not *SHO1*, *STE20* or *STE50* promoted the growth of IPAC-bearing cells under SDS stress, suggesting the existence of a novel pathway for signalling to Slt2 that is mediated by the MAPKKK Ssk2.

Ssk2 is necessary for full Slt2 activation in response to SDS

In order to analyse the role of Ssk2 in signalling through the CWI pathway in response to SDS, we first studied the time course of Slt2 phosphorylation and *MLP1* induction in cells stressed with the detergent. As observed in Fig. 5A, SDS promoted a very fast activation of Slt2. This high and rapid Slt2 phosphorylation peaked at 1 min, declined after this time and then slowly increased to reach a maximum at 120 min. Whereas the first burst of Slt2 phosphorylation was not affected in *ssk2Δ* mutants, the long-term activation significantly diminished in comparison with wild-type cells. This reduction in the amount of phosphorylated Slt2 was also observed in cells lacking either Pbs2 or Hog1 (Fig. 5A). Moreover, SDS-induced *MLP1-lacZ* expression was severely reduced in both *ssk2Δ* and *hog1Δ* mutants (Fig. 5B). Interestingly, Hog1 also seemed to contribute in signalling to Slt2 in response to Congo red, since signalling was reduced by the half in mutants lacking this MAPK. In summary, these results indicate that SDS triggers firstly a very fast and transient activation of the CWI pathway and, secondly, a slow and sustained response that is significantly mediated by Ssk2, Pbs2 and Hog1.

Phosphorylation of Slt2 under 1 M sorbitol treatment has also been described to be Pbs2-dependent [12]. In order to explore whether Ssk2 is involved in this activation, we performed an analysis of Slt2 phosphorylation in response to this osmotic stress in WT and *ssk2Δ* strains. As shown in Fig 5C, the absence of Ssk2 did not alter either the amount of phosphorylated Slt2 or the activation time course, indicating that this stress is not routed through this MAPKKK to Slt2.

Heat stress activation of the CWI pathway involves superficial redistribution of some components operating in the CWI pathway, such as Rho1, likely to repair cell wall damage [15]. In the absence of stress, Pkc1 is localised at sites of polarised growth, namely bud necks at cytokinesis and emerging bud tips [29,30]. Following a cell wall stress, Pkc1 relocates to specific regions beneath the cell surface [29]. Then, Rho1-GTP activates Pkc1, which in turn activates the downstream MAP kinase cascade. We then studied the effect of SDS on Pkc1 subcellular localisation. As observed in Fig. 5D, SDS promoted relocalisation of Pkc1 to the

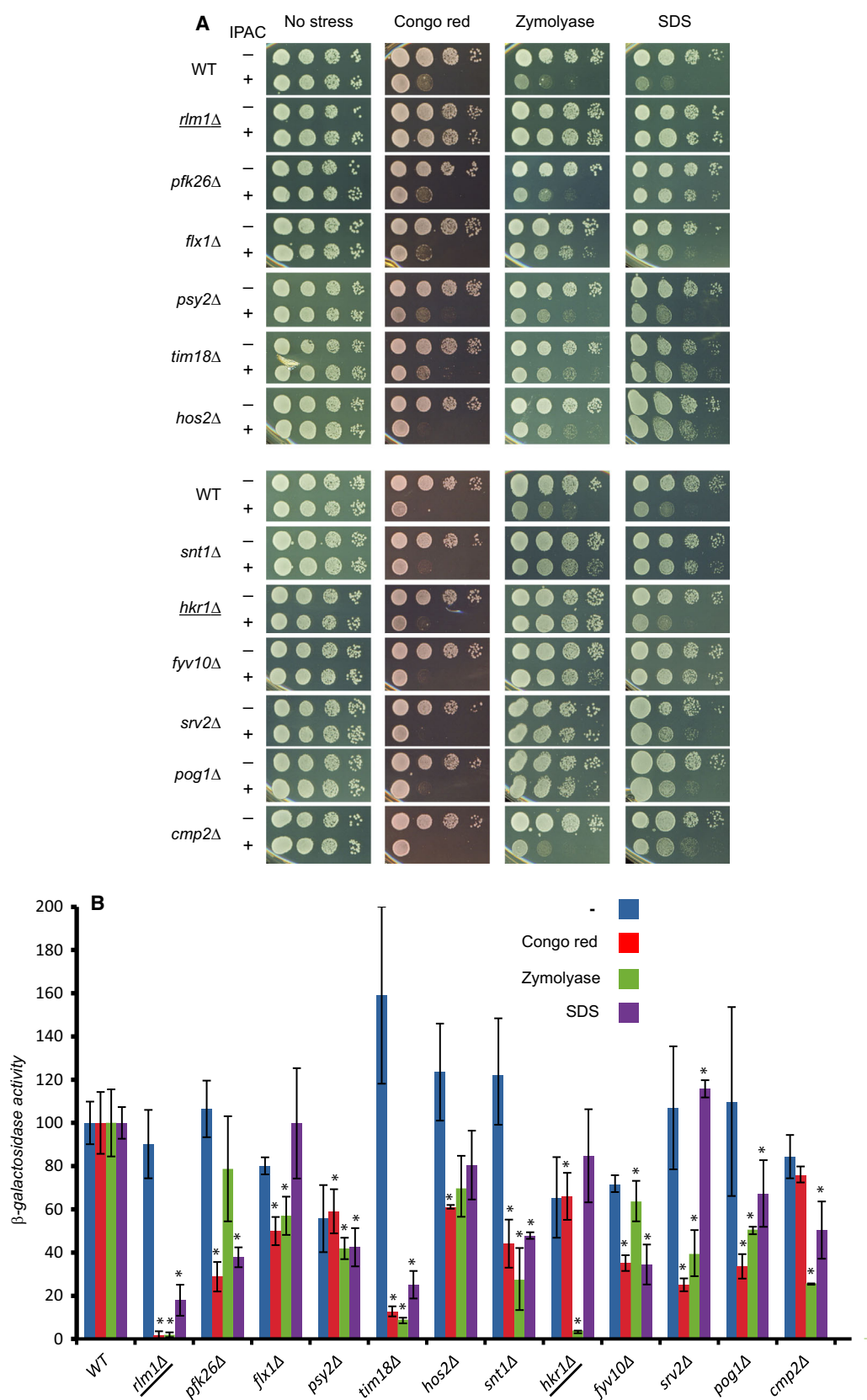


Fig. 4. Deletion of different genes reduces the sensitivity and transcriptional response of IPAC-containing cells to CWI pathway-activating compounds. (A) Sensitivity of BY4741 (WT) and the indicated isogenic mutant strains bearing the empty vector pHR70 (–) or plasmid pHR70-IPAC (+) to different stresses. Ten-fold serial dilutions of cell suspensions were spotted onto SD Ura[–] pH 6.5 plates in the absence (no stress) or presence of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CR, 150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of zymolyase or 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS, and incubated at 30 °C for 48 h. A representative assay from three different experiments is shown. Mutant strains used as controls are underlined. (B) Transcriptional response of BY4741 (WT) and the indicated isogenic mutant strains transformed with the p*MLP1-lacZ* plasmid. β -Galactosidase activity was determined in the absence (–) or presence of CR (30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 4 h), zymolyase (8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 4 h) or SDS (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for 4 h). Data represent the average of the activity of three independent transformants as the percentage relative to the WT strain (100%). Mutant strains used as controls are underlined. Error bars indicate the standard deviation. One asterisk indicates a *P*-value of < 0.05 using Student's *t*-test.

bud periphery. However, this effect was independent of the presence of Ssk2 (see Fig. 5D). Therefore, Ssk2 does not seem to affect the formation of plasma membrane-associated CWI pathway signalling complexes upon SDS stress.

Ssk2 activation leads to CWI stimulation via Pbs2/Hog1

To learn more about this novel pathway towards Slt2, we next analysed the ability of a constitutively activated Ssk2-mediated branch of the HOG pathway to trigger Slt2 activation. Overexpression of Ssk2^{AN}, a constitutively active Ssk2 version lacking the N-terminal regulatory domain [31,32], resulted in a Bck1-dependent phosphorylation of Slt2 that also required Pbs2 and Hog1 (Fig. 6A). In contrast, removal of any of the GEF proteins for Rho1, namely Rom1, Rom2 or Tus1, did not block Ssk2^{AN}-induced Slt2 activation. Moreover, growth inhibition promoted by overexpression of this Ssk2 version was abolished in *pbs2Δ* and *hog1Δ* mutants, even in the presence of the IPAC (Fig. 6B). These results indicate that the activation of Ssk2 results in Slt2 phosphorylation via the Pbs2-Hog1 kinase module. Ssk2^{AN}-triggered Slt2 activation required both the phosphorylation and the catalytic activity of Hog1, as evidenced by the lack of Slt2 activation observed in cells expressing the kinase-dead (Hog1^{K52M}) and the nonphosphorylatable (Hog1^{T174A,Y176A}) mutant versions (Fig. 6C). In order to further explore the connection between the HOG and CWI pathways, we also constructed the constitutively active version of Pbs2, Pbs2^{EE}. This version contains glutamic residues instead of the serine 514 and threonine 518, whose changes to aspartic residues were previously described to activate Pbs2 without the involvement of upstream elements by mimicking phosphorylation events [31]. Galactose-induced expression of Pbs2^{EE} did not lead to growth inhibition in wild-type, but promoted lethality in IPAC-engineered cells, indicating that Pbs2-promoted signalling was transmitted to the CWI MAPK module. As expected, under these conditions *SSK2* deletion did not affect IPAC activation,

but removal of either Hog1 or Bck1 strongly reduced IPAC-induced growth inhibition (Fig. 6D), confirming that the signal flows through Hog1 and Bck1.

The lack of any of the transcription factors operating downstream of Hog1, including Hot1, Smp1, Msn2, Msn4, Msn1, the transcription repressor Sko1 and the Hog1-substrate kinase Rck2 [7], did not alleviate the SDS-induced growth inhibition of IPAC-bearing cells (not shown). In fact, the Hog1-dependent signalling to Slt2 does not rely on any of its nuclear functions, since deletion of the gene coding for the Hog1 importin Nmd5 [10] neither affected SDS or Congo red activation of CWI signalling, as determined by *MLP1p-lacZ* transcriptional reporter induction (Fig. 7A), nor growth inhibition in IPAC-bearing cells (Fig. 7B) or Slt2 phosphorylation (Fig. 7C). In line with this, SDS treatment did not lead to Hog1 translocation to the nucleus, in contrast to that observed under osmotic shock (Fig. 7D).

The MKKs and MAPKs of the HOG and CWI pathways form a protein complex

The fact that it is not necessary for Hog1 to be translocated to the nucleus for signalling to Slt2 suggests that the Pbs2-Hog1 module could be directly regulating components of the CWI pathway. We then analysed the existence of physical interactions of Pbs2 and Hog1 with Mkk1 and Slt2. We used the GST-Pbs2^{EE} expressing plasmid to explore whether Mkk1 and Slt2 interact with this MAPKK. As shown in Fig. 8A,B, GST-Pbs2^{EE} was able to pull down both Slt2-myc and Mkk1-myc. GST-Pbs2^{EE} also pulled down endogenous Slt2, as did GST-Slt2 and GST-Mkk1. Moreover, endogenous Hog1 copurified with GST-Slt2 and GST-Mkk1, as well as with GST-Pbs2^{EE} (Fig. 8C). These results suggest physical interaction between these four proteins in a complex. Interestingly, interaction between GST-Mkk1 and GST-Slt2 with Hog1 was not impaired by the absence of Ssk2, Bck1, Mkk1/2, Slt2 or Pbs2 (Fig. 9), suggesting a direct binding of Hog1 to either Mkk1 or Slt2.

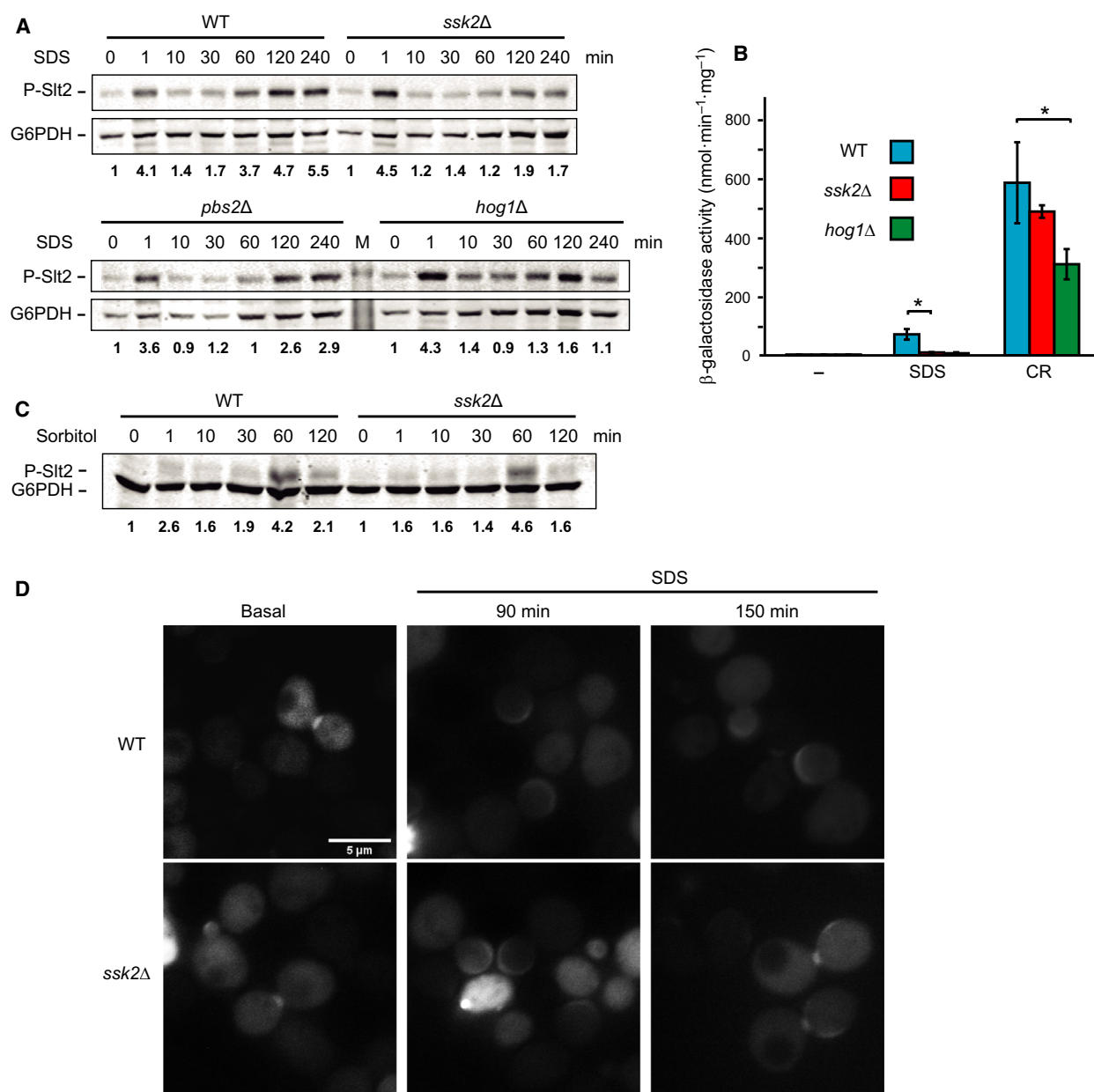
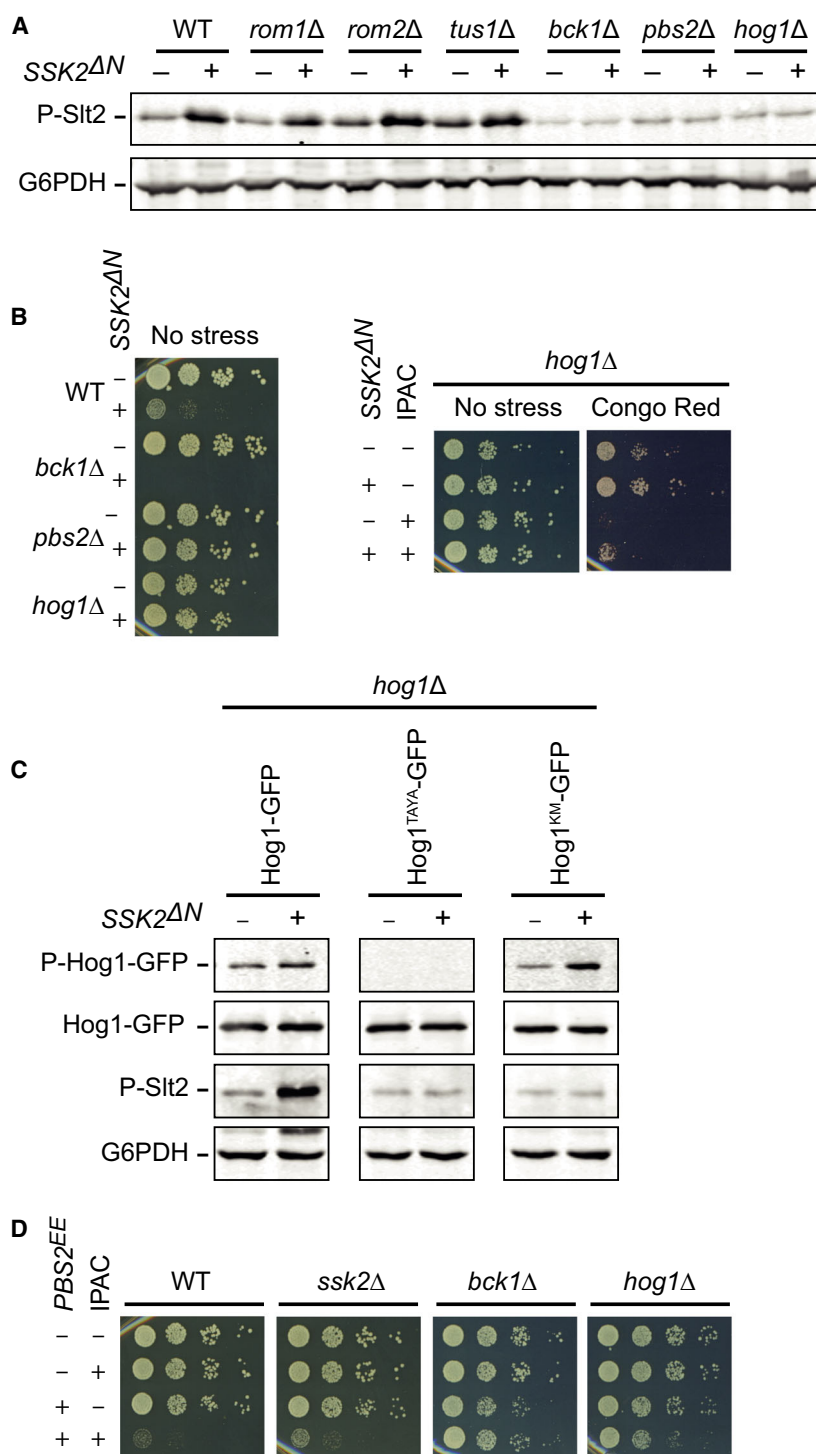


Fig. 5. *ssk2Δ* mutants show reduced signalling through the CWI pathway in response to SDS. (A) Western blotting analysis of extracts of BY4741 (WT), *ssk2Δ*, *pbs2Δ* and *hog1Δ* cells cultured in YPD at 30 °C and treated with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS for the indicated times (min). Dually phosphorylated Slt2 and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42 and anti-G6PDH antibodies, respectively. The numbers below show the amount of phosphorylated Slt2, normalised with respect to the level in the absence of stress. M corresponds to the lane loaded with the molecular weight protein marker. Representative blots from two independent experiments are shown. (B) β -Galactosidase activity of cell extracts from the wild-type strain BY4741 (WT) and the isogenic *ssk2Δ* and *hog1Δ* strains bearing the *pMLP1-lacZ* plasmid. Cells were either left untreated (–) or treated for 4 h with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS or 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CR. Data represent the average of β -galactosidase activity of three independent transformants. Error bars indicate standard deviation and one asterisk a *P*-value of < 0.05 by two-tailed Student's *t*-test. (C) Western blotting analysis of extracts of BY4741 (WT) and *ssk2Δ* cells cultured in YPD at 30 °C and treated with 1 M sorbitol for the indicated times (min). Dually phosphorylated Slt2 and G6PDH (as a loading control) were detected as above. The numbers below show the amount of phosphorylated Slt2, normalised as in A. A representative blot from two independent experiments is shown. (D) Pkc1 localisation upon SDS treatment. Fluorescence microscopy images of BY4741 (WT) and the isogenic *ssk2Δ* mutant cells, both expressing Pkc1-GFP from plasmid pVD67, cultured in YPD in basal conditions or treated with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS for the indicated times. Representative photographs from three different experiments are shown. Scale bar = 5 μm .

Fig. 6. Constitutive activation of the Ssk2 branch of the HOG pathway leads to CWI pathway activation. (A) Western blotting analysis of extracts of BY4741 (WT) and the isogenic *rom1Δ*, *rom2Δ*, *tus1Δ*, *bck1Δ*, *pbs2Δ* and *hog1Δ* strains expressing the constitutively active Ssk2^{AN} version (+) (pRS413-pGAL1-SSK2^{AN}) or not (–) (pCW194). Cells were cultured in SG His– at 30 °C for 4 h. Dually phosphorylated Slt2 and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42 and anti-G6PDH antibodies, respectively. (B) Ten-fold serial dilutions of BY4741 (WT), *bck1Δ*, *pbs2Δ* and *hog1Δ* expressing Ssk2^{AN} (+) (pRS413-pGAL1-SSK2^{AN}) or not (–) (pCW194) spotted onto SG His– pH 6.5 plates without stress and incubated at 30 °C for 72 h (left panel). Ten-fold serial dilutions of *hog1Δ* cells expressing Ssk2^{AN} (+) (pRS413-pGAL1-SSK2^{AN}) or not (–) (pCW194) and the IPAC (+) (YCplac111-IPAC) or not (–) (YCplac111), spotted onto SG His– Leu– pH 6.5 plates in the absence (no stress) or presence of 5 μg·mL^{–1} of CR, and incubated at 30 °C for 72 h (right panel). (C) Western blotting analysis of extracts of *hog1Δ* cells bearing *HOG1-GFP* (pRS416-*HOG1-GFP*), a nonphosphorylatable version (pRS416-*HOG1*^{TAYΔ}-*GFP*) and a kinase-dead version (pRS416-*HOG1*^{KMΔ}-*GFP*) in combination with SSK2^{AN} (+) (pRS413-pGAL1-SSK2^{AN}) or vector pCW194 (–). Cells were cultured in SG Ura– His– at 30 °C for 4 h. Phosphorylated Hog1, GFP-fused Hog1, dually phosphorylated Slt2 and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p38, anti-GFP, anti-phospho-p44/42 and anti-G6PDH antibodies, respectively. (D) Ten-fold serial dilutions of BY4741 (WT), *ssk2Δ*, *bck1Δ* and *hog1Δ* cells bearing pEG(KG)-*PBS2*^{EE} or pEG(KG) (–) and YCplac111-IPAC (+) or YCplac111 (–). Cell suspensions were spotted onto SG Ura– Leu– pH 6.5 plates and incubated at 30 °C for 72 h.



Discussion

Here, we demonstrated that engineering yeast cells with synthetic positive feedback loops constitutes an excellent approach for gaining insight into different aspects of MAPK signalling, such as identifying novel

components involved in the response to a specific stress. Since hyperactivation of the CWI pathway leads to lethality [25], we reasoned that introduction of a structural gene coding a hyperactive kinase operating in this pathway under the control of a pathway-

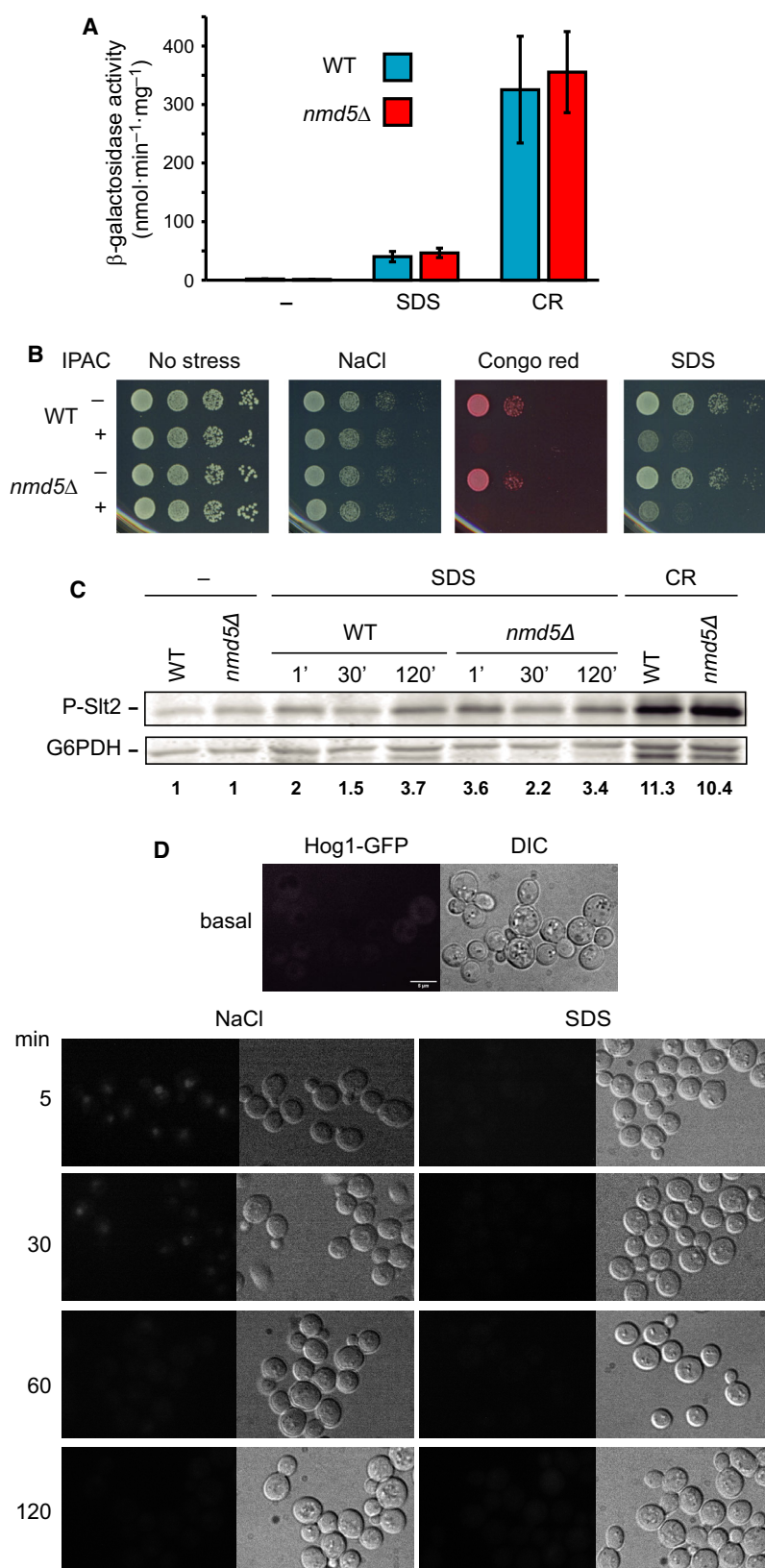


Fig. 7. Hog1 is not imported to the nucleus in response to SDS. (A) β -Galactosidase activity of cell extracts from the BY4742 (WT) and the isogenic APY276 (*nmd5* Δ) mutant strain, both bearing the *pMLP1-lacZ* vector. Cells were either left untreated (–) or treated for 4 h with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS or 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CR. Data represent the average of β -galactosidase activity of three independent transformants. Error bars indicate standard deviation. (B) Ten-fold serial dilutions of BY4742 (WT) and the isogenic APY276 (*nmd5* Δ) mutant cells bearing the IPAC (+) (pHR70-IPAC) or not (–) (pHR70). Cell suspensions were spotted onto SD Ura– pH 6.5 plates in the absence (no stress) or presence of 0.8 M NaCl, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CR and 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS, and incubated at 30 °C for 48 h. A representative assay is shown from two different experiments with distinct transformants. (C) Western blotting analysis of extracts of PW245 (WT) and the isogenic PW349 (*nmd5* Δ) mutant cells cultured in YPD at 30 °C for 2 h and treated with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS for the indicated times (h) or 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of CR for 4 h. Dually phosphorylated Slt2 and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42 and anti-G6PDH antibodies, respectively. The numbers below show the amount of phosphorylated Slt2 normalised with respect to the loading control for each sample and expressed as fold increase relative to either the WT or *nmd5* Δ level in the absence of stress. A representative blot from two independent experiments is shown. (D) Fluorescence and DIC (differential interference contrast) microscopy of PW245 cells expressing Hog1-GFP, cultivated in YPD (basal) and treated with 0.9 M NaCl or 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of SDS for the indicated times. Representative photographs from three independent experiments are shown. Scale bar = 5 μm .

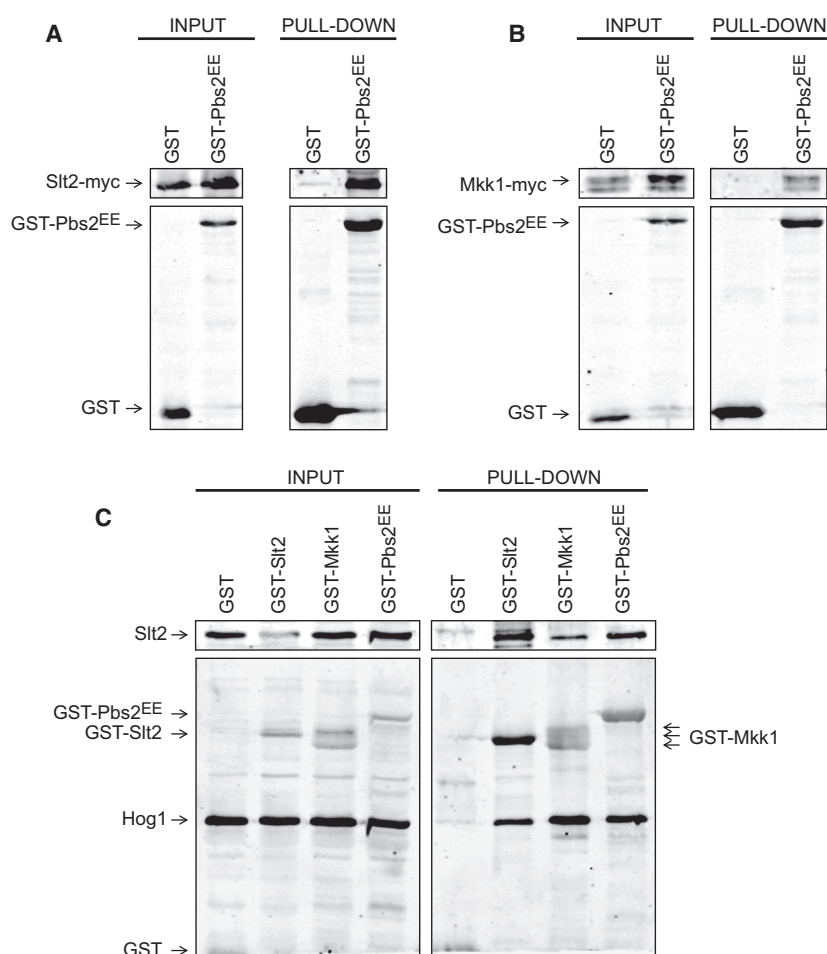


Fig. 8. The MAPKs and MAPKs of the HOG and CWI pathways physically interact, forming a complex. The strains BY4741 *SLT2-6MYC* (A) and BY4741 *MKK1-6MYC* (B) were transformed with the plasmid pEG(KG)-*PBS2*^{EE} expressing GST-fused Pbs2^{EE}, or pEG(KG) expressing GST alone under control of the *GAL1* promoter; and the strain BY4741 (C) was transformed with plasmids expressing Slt2 (pEG(KG)-*SLT2*), Mkk1 (pEG(KG)-*MKK1*) or Pbs2^{EE} (pEG(KG)-*PBS2*^{EE}) fused to GST under control of the *GAL1* promoter. Transformants were grown in SG Ura– at 30 °C for 6 h, and cell extracts (input) were incubated with glutathione-Sepharose beads to purify GST complexes (pull-down). Slt2-myc (A), Mkk1-myc (B), endogenous Hog1 and Slt2 (C) and GST or the indicated GST-fused proteins (A–C) were detected with anti-myc, anti-Hog1 anti-Slt2 and anti-GST antibodies, respectively. Representative blots from two (A, B) and three (C) different experiments are shown.

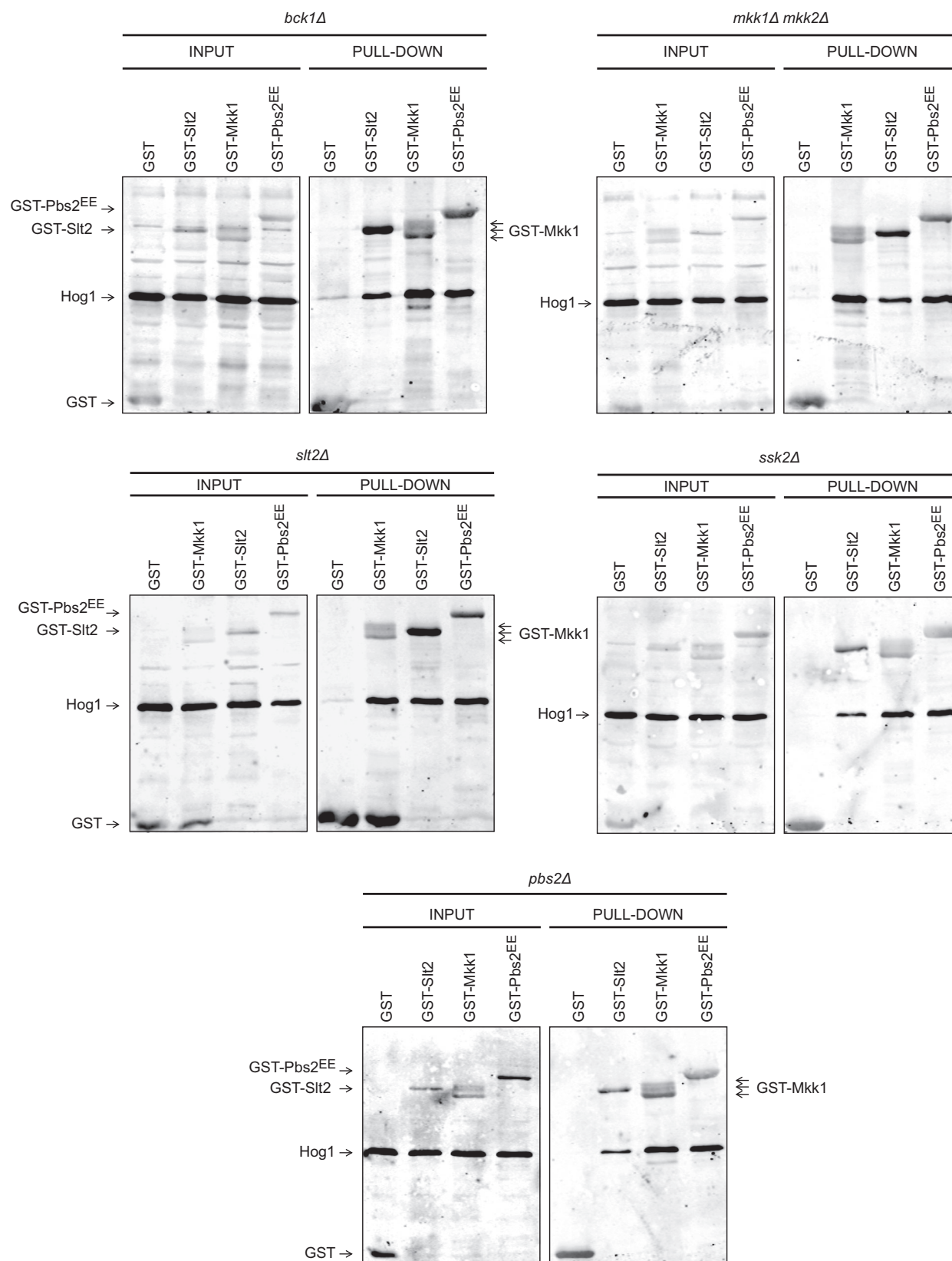


Fig. 9. Bck1, Mkk1/Mkk2, Slt2, Ssk2 and Pbs2 are not necessary for the physical interaction between components of the HOG and CWI pathways. BY4741 (WT) and the isogenic *bck1Δ*, *mkk1Δmkk2Δ*, *slt2Δ*, *ssk2Δ* and *pbs2Δ* mutant strains were transformed with plasmids expressing Mkk1 (pEG(KG)-MKK1), Slt2 (pEG(KG)-SLT2) or Pbs2^{EE} (pEG(KG)-PBS2^{EE}) fused to GST under control of the *GAL1* promoter. Transformants were grown in SG Ura⁻ at 30 °C for 6 h, and cell extracts (input) were incubated with glutathione-Sepharose beads to purify GST complexes (pull-down). Hog1 and GST-fused proteins were detected with anti-Hog1 and anti-GST antibodies, respectively. Representative blots from two experiments are shown.

induced promoter would create a positive feedback circuit that, when triggered, would ultimately lead to growth inhibition. This was the case, as exposure of cells carrying the so-called IPAC to very low concentrations of a cell wall-altering agent, such as Congo red, inhibited yeast growth. This phenotype clearly relies on the integrity of the loop, since the lack of Rlm1 abolishes the IPAC-induced growth inhibition. The effect on growth was concomitant with high Slt2 phosphorylation levels and Mlp1 transcriptional induction, which indicates that the IPAC strongly increases the level of signalling and confers cell wall stress hypersensitivity. Results obtained from both readouts indicate that a sustained increase of threefold or fourfold over the wild-type CWI response is enough to confer lethality. We also found that a very transient stress, such as that provoked by hypotonic shock, sparked the positive feedback loop in a very fast manner, but also decayed rapidly in both wild-type and IPAC-containing cells, suggesting that this circuit does not promote bistability [33].

It is important to stress the potential power of the IPAC for drug discovery: on the one hand, as a highly sensitive testbed for finding novel antifungal molecules that alter the cell wall; on the other hand, to screen for MAPK signalling inhibitors based on their ability to prevent death in IPAC-containing cells subjected to CWI pathway stimulation. Besides potential applications as antiproliferative drugs in humans, such MAPK inhibitors could be used as synergistic antifungal drugs with known cell wall-targeted compounds, due to their ability to hinder the CWI pathway compensatory mechanism.

The IPAC is also a powerful tool for identifying subtle modulators of signalling, the deficiency of which does not promote a sensitivity phenotype and, therefore, is difficult to identify in phenotypic screenings. Exploiting the IPAC, we have found several genes, such as the two histone deacetylases Hos2 and Snt1 of the Set3 complex (Set3C) [34] that, when mutated, allowed IPAC-bearing cells to grow under cell surface stress. Set3C is important in regulating gene induction after changes in carbon sources [35], nitrogen starvation [34] and DNA damage [36]. Furthermore, this complex was found to signal secretory stress through

the CWI pathway, as *HOS2* or *SNT1* deletion abrogated Slt2 phosphorylation in response to tunicamycin and provoked sensitivity to tunicamycin or 1,4-DTT [37]. Although *hos1* and *snt1* mutants do not show sensitivity to compounds such as SDS, zymolyase and Congo red, our results suggest the involvement of this complex in the response of the CWI pathway to plasma membrane and cell wall stress and suggest that the role of this complex within the CWI pathway merits further research.

The necessity of Pfk26 for full signalling through the CWI pathway is another interesting point to stress. Pfk26 is one of the two isoforms of 6-phosphofructose-2-kinase, responsible for the synthesis of fructose-2,6-bisphosphate, a strong allosteric regulator of the glycolytic enzyme phosphofructokinase. Remarkably, the main target of phosphorylation among the enzymes regulating the yeast carbon metabolism is Pfk26, which can be considered as a phosphorylation hub [38]. In fact, Pkc1 phosphorylates Pfk26, causing its inactivation [39]. The consequent reduction of glycolysis has been proposed to lead to an accumulation of glucose-6-phosphate for the synthesis of glucan, as part of the cellular response to stress [38]. Moreover, nonallosteric phosphofructokinase mutants, that is insensitive to fructose-2,6-bisphosphate activation, were affected in sensitivity towards caffeine and Congo red [40]. Our results reinforce the idea that strong connections between the central carbon metabolism and cell wall regulation exist, as indicated by the CWI defects observed in mutants lacking the SNF1 complex [41].

Other mutants identified in the IPAC-based screening were the mitochondrial translocator Flx1, which catalyses the movement of the redox cofactor FAD across the mitochondrial membrane [42], and Tim18, an integral component of the translocase of the mitochondrial inner membrane complex TIM22 [43,44]. These results suggest the important role of mitochondrial function for signalling through this route. Interestingly, Srv2 also appeared as a protein important for full signalling through the pathway. Recently, Srv2 was shown to modulate yeast mitochondrial morphology and respiration by regulating actin assembly [45]. All this evidence suggests the relationship between mitochondrial activity and the CWI pathway and is

consistent with the reported regulation of mitochondrial fission by this pathway through cyclin C [46].

Among the signalling proteins identified using the IPAC tool, Ssk2 is of special interest. Although the *ssk2Δ* mutant is not SDS-sensitive, the hypersensitivity of this circuit for monitoring signalling has unveiled the role of Ssk2 as an input for the CWI MAPK in response to SDS. Some reports indicate that Hog1 may be activated by an alternative mechanism to the known sensors of the Sho1 and Sln1 branches, and that Ssk2 could be activated by an alternative route as an additional input for Hog1 phosphorylation under severe hyperosmotic stress [47,48]. However, phosphorylation of this MAPK in the absence of the known sensors of both branches fails to induce a protective response due to a diminished transcription activity of hyperosmolarity-responsive genes and defects in cell cycle regulation [49]. It is therefore tempting to speculate that one of the main roles of this alternative pathway could be to feed the CWI pathway.

Ssk2 binds actin and seems to sense disassembly of the actin cytoskeleton after osmotic stress [50]. Since the function of Ssk2 affects actin and MAPK signalling, Ssk2 makes an excellent candidate for coordinating these two cellular processes. The existence of proteins acting as actin sensors has been documented: for example, the mammalian transcription factors SRF and MRTF, which are maintained in an inactive conformation in the cytoplasm at high concentrations of G-actin [51]. If Ssk2 senses actin disorganisation, it would signal to Slt2 via Pbs2-Hog1 in response to other stimuli that promote actin cytoskeleton depolarisation, such as Congo red. This is indeed the case, as *ssk2Δ* or *hog1Δ* mutants show a reduced signalling through the CWI pathway in response to Congo red. However, the Congo red-induced signalling is able to trigger IPAC-induced lethality, even in *ssk2Δ* mutants, indicating that the putative sensing of actin by Ssk2 is not the only input for Slt2 activation in such conditions. In contrast, most of the signalling flows through the Ssk2-Hog1-Slt2 alternative pathway in the case of SDS. In agreement with this, the response to SDS is Rom2-independent, whereas Rom2-mediated CWI canonical pathway mostly conveys the signalling induced by Congo red.

Our results indicate that the Ssk2-mediated signalling unveiled herein acts in addition to its role in repairing the actin cytoskeleton. Amberg's group showed that Ssk2 works in the actin recovery pathway independently of the HOG pathway, but it requires Bni1, Pea2 or Bud6 [17]. However, the Ssk2-induced CWI activation pathway is mediated by the Pbs2-Hog1 module and does not require any of these

proteins (data not shown). An attractive possibility is that Ssk2 is activated by actin depolarisation and participates in actin repolarisation, but also in signalling to Pbs2-Hog1, which ultimately will lead to CWI activation. Interestingly, actin binding stimulates the relocalisation of Ssk2 from the cytoplasm to the mother bud neck [50]. Furthermore, inactive Pbs2 localises at the mother bud neck during osmostress [52], and key components of the CWI pathway such as Pkc1, Slt2 and the sensors Wsc1 and Wsc2 also display a polarised localisation at the cytokinetic bud neck [53,54]. Therefore, it is tempting to speculate that Ssk2 relocalisation to the bud neck following SDS stress would allow activated Hog1 to impinge on the CWI pathway. This is supported by our finding of physical interactions among the components of the CWI and HOG MAPK modules. Formation of protein complexes composed of these components would also explain some of the crosstalks observed between these two pathways [12,13].

In summary, we demonstrate the feasibility of generating powerful tools for a better understanding of signalling pathways by expressing synthetic positive feedback loops that result in growth inhibition.

Materials and methods

Yeast strains and culture conditions

Unless otherwise stated, the yeast strains used in this work were *S. cerevisiae* BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) and the isogenic *kanMX4* deletion mutants. These mutants, including those used for the screening (Table S1), were from Euroscarf. Wild-type BY4742 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) and its isogenic *nmd5Δ::HIS3* mutant strain APY276 [55], PW245 strain (*HOG1-GFP-TRP1*) and the isogenic PW349 (*HOG1-GFP-TRP1 nmd5::URA3*) [56], YMF3 (BY4741 *SLT2-6MYC*) [57] and YMJ21 (BY4741 *MKK1-6MYC*) [58] have been previously described.

Yeast cultures were performed in yeast extract–bacto-peptone–dextrose (YPD, 1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose), selective synthetic dextrose media (SD, 0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulfate, 2% dextrose, supplemented with the required amino acids), selective synthetic galactose media (SG, the same as SD but with galactose instead of dextrose) or selective synthetic raffinose media (SR, the same as SD but with raffinose instead of dextrose), either broth or agar.

DNA manipulation and plasmids

General DNA methods were performed using standard techniques.

To obtain plasmid YCplac111-IPAC, the restriction sites *PspOM1* and *BamH1* were first introduced by PCR into the *LEU2*-based centromeric plasmid YCplac111 [59] by cloning the *EcoR1-HindIII* DNA fragment amplified by PCR with primers *EcoR1-PspOM1* (5'-GGGAATTCGGGCCCCATGCCGTTTACATTTTCAGATC-3') and *BamH1-HindIII* (5'-CGGATCCCTAAAGCTTCCCGTTATTATTATAATTAAACATC-3') using the plasmid pGEX-KG-SteC as template [60]. Then, the IPAC cassette, previously constructed by successive cloning of the *MLP1* promoter, PCR-amplified from genomic DNA with oligonucleotides 5'-CCCCGGGGCCACACAAGAACGTGGGCGATAC-3' (*PspOM1*) and 5'-CCCTCGAGCATTTAATTGTGAATCTTTCTTCG-3' (*XhoI*), the *MKK1*^{S386P} coding sequence, PCR-amplified with oligonucleotides 5'-CCCGTCGACTCGAGATGGCTTCACTGTTCA GACC-3' (*XhoI*) and 5'-CCCGTCGACTTAATCTTTCCA GCACTTCC-3' (*SalI*) using plasmid as pNV7-MKK1^{P386} [25] as template, and the *ADH1* terminator, PCR-amplified with oligonucleotides 5'-CCCCGGATCCGTCGACCCCTGAGTAATAAGCG-3' (*SalI*) and 5'-CCCCGGATCCCGGTGGTGGTCAATAAG-3' (*BamH1*) from genomic DNA, was sub-cloned into *PspOM1* and *BamH1* sites of YCplac111. pHR70-IPAC was obtained by cloning the *EcoR1-BamH1* containing the genetic circuit from YCplac111-IPAC into the *URA3*-based centromeric plasmid pHR70 [19].

pEG(KG)-PBS2^{EE} was constructed by overlapping PCR amplifying the *PBS2* gene with oligonucleotides 5'-CCCGTCGACTCGAGATGGAAGACAAGTTTGC-3' (*SalI*) and 5'-CCC GTCGACCTATAAACCACCCATATG-3' (*SalI*) and the mutagenic primers 5'-CTGGTAATTTGGTGGCAG AATTAGCGAAGGAAAATATTGGTTGTCAGTC-3' and 5'-GACTGACAACCAATATTTTCCCTCGCTAATTCTGC CACCAAAATTACCAG-3'. These primers led to the replacement of amino acids Ser514 and Thr518 of Pbs2 by Glu [31]. Thus, this PBS2^{EE} allele contained substitution mutations that were similar to the changes to Asp previously described that mimic the activating phosphorylation events and activate Pbs2p without the involvement of upstream elements (Ssk2p, Ssk22p and Sho1p) [31].

Plasmids pRS416-*HOG1-GFP*, pRS416-*HOG1*^{TAY}-*GFP* and pRS416-*HOG1*^{KM}-*GFP* [10], pEG(KG), pEG(KG)-SLT2, pEG(KG)-*MKK1* [61], p*MLP1-lacZ* [62], pCW194 and pRS413-p*GAL1-ssk2ΔN* [32] and pVD67 [30] have been described previously.

Halo sensitivity assay

Yeast cells were cultured overnight at 30 °C in SD Leu–pH 6.5 liquid medium. A volume of 100 μL of this saturated culture was resuspended in 4 mL of SD Leu–pH 6.5 with 0.7% agar and poured onto SD Leu–pH 6.5 plates. Sterile 6-mm-diameter paper discs were impregnated with 20 μL of the indicated solution and placed over the top-layer agar. Plates were incubated at 30 °C for 48 h, and the generated inhibition halos were photographed.

Multiwell plate sensitivity assay

Yeast cells from an overnight culture were diluted to a final optical density (OD)₅₉₅ of 0.01 and cultured at 30 °C in multiwell plates containing YPD with serial dilutions of zymolyase at the indicated concentrations. Growth was determined as OD₅₉₅ after 12.5 h of incubation using a Bio-Rad 680 microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Hyperosmotic shock

Yeast cells were cultured overnight at 30 °C in YPD and then transferred to the same fresh medium for a final OD₅₉₅ of 0.3, cultured for an additional 2 h, collected by centrifugation and then resuspended in YPD containing 1 M sorbitol.

Hypotonic shock

Yeast cells were cultured overnight at 24 °C in YPD containing 1 M sorbitol and then transferred to the same fresh medium for a final OD₅₉₅ of 0.3, cultured for an additional 3 h, collected by centrifugation and then resuspended in YPD.

Yeast drop dilution growth assays

Growth assays on solid media were performed by culturing cells in YPD or selective SD medium to an OD₅₉₅ of 0.5 and spotting samples (5 μL) of 10-fold dilutions of the cell suspensions onto the surface of plates followed by incubation at 30 °C for 48–72 h.

Genetic screening on a subcollection of mutant strains of *S. cerevisiae*

A subcollection of mutants (Table S1) was distributed in 96-well plates and transformed with the plasmid YCplac111-IPAC. The plates were incubated at 30 °C for 72 h until the appearance of sediment in the well, corresponding to transformed yeasts. Five microlitres of these cultures was diluted into new multiwell plates containing 200 μL of SD medium lacking leucine to inoculate plates of solid SD medium lacking leucine and containing Congo red (10 μg·mL⁻¹), zymolyase 100 T (150 μg·mL⁻¹) or SDS (0.01%) with a pin replicator. Plates were incubated for 48 h at 30 °C. After incubation, those mutants capable of suppressing the growth inhibition phenotype caused by the IPAC were obtained again from the collection stock and transformed with the plasmid pHR70-IPAC. Their ability to grow on SD plates without uracil in the absence or presence of the same compounds and concentrations at 30 °C for 48 h was confirmed by drop growth assays.

Preparation of yeast extracts and immunoblotting analysis

The procedures used for obtaining yeast extracts, fractionation by SDS/PAGE and transfer to nitrocellulose membranes have been described previously [19]. Mouse monoclonal anti-Slt2 (Santa Cruz Biotechnology; Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-Hog1 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit monoclonal anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204) antibody (Cell Signaling, Danvers, MA, USA), rabbit monoclonal anti-phospho-p38 (Cell Signaling), mouse monoclonal anti-GFP (Clontech, Kyoto; Japan), mouse monoclonal anti-myc (Millipore, Burlington, MA, USA), rabbit polyclonal anti-GST (Santa Cruz Biotechnology) and rabbit polyclonal anti-G6PDH (Sigma, St. Louis, MO, USA) were used to recognise Slt2, Hog1, dually phosphorylated Slt2, dually phosphorylated Hog1, GFP, myc, GST and G6PDH as a loading control, respectively. The primary antibodies were detected using a fluorescently conjugated secondary antibody with an Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA).

Copurification experiments

Yeast cells expressing *GALI*-driven GST-fused proteins (Slt2, Mkk1, Pbs2^{EE} and Hog1) were cultured overnight at 30 °C in selective synthetic SR medium lacking uracil, refreshed in selective synthetic SG medium lacking uracil at OD₅₉₅ = 0.3 and cultured at 30 °C for an additional 6 h. Cells were collected on ice, pelleted and resuspended in cold lysis buffer [50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8), 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 50 mM β-glycerol phosphate, 1 mM sodium orthovanadate] supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor mixture (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were glass-bead-lysed and whole extracts clarified and incubated with glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) overnight at 4 °C. Beads were extensively washed with lysis buffer lacking PMSF and protease inhibitor mixture. 2× SDS loading buffer was added; proteins were boiled for 5 min and analysed by SDS/PAGE and immunoblotting.

β-Galactosidase activity assays

β-Galactosidase activity was determined as described previously [62]. In brief, extracts were obtained by breaking cells with glass beads. β-Galactosidase activity was spectrophotometrically determined at 415 nm by using *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside as substrate and expressed as nmoles of *o*-nitrophenol·min⁻¹·mg⁻¹ of total protein, as quantified by Bradford assay.

Microscopy techniques

For GFP *in vivo* fluorescence microscopy, cells were cultured in SD or YPD overnight at 24 °C. They were refreshed to an OD₅₉₅ = 0.3 with YPD and incubated for 1.5 h in a shaker at 24 °C. Then, 0.9 M NaCl or SDS 0.01% was added to the cultures and samples were taken at different time points and analysed by fluorescence microscopy.

Cells were visualised in an Eclipse TE2000U microscope (Nikon, Tokyo, Japan) using the appropriate sets of filters. Digital images were acquired with Orca C4742-95-12ER charge-coupled device camera (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) and processed with the HCIMAGE software (Hamamatsu).

Acknowledgements

We thank Sergio Peisajovich, Wendel Lim, Henrick Dohlman, David Levin and Javier Arroyo for materials used in this study. We also thank colleagues from Unit 3 of the Departamento de Microbiología y Parasitología at UCM for useful comments and discussion throughout the work. We acknowledge the Servicio de Genómica y Proteómica (UCM, Madrid, Spain) for DNA sequencing. This work was supported by grant BIO2016-75030-P from Ministerio de Economía y Competitividad (Spain), and S2017/BMD-3691 (InGEMICS-CM) funded by Comunidad de Madrid (Spain) and European Structural and Investment Funds. EA-R was recipient of a FPI contract from Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). EJ-G is recipient of a predoctoral contract from Universidad Complutense de Madrid. EA-C is recipient of a laboratory assistant contract from Comunidad Autónoma de Madrid and cofunded by Fondo Social Europeo within Programa Operativo de Empleo Juvenil and Iniciativa de Empleo Juvenil (YEI).

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Author contributions

EJ-G, EA-R, EA-C and TF-A conducted the experiments and analysed the results. MM analysed the results and wrote the paper. HM conceived the idea for the project, analysed the results and wrote the paper with MM.

References

- 1 Krishna M & Narang H (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci* **65**, 3525–3544.

- 2 Chen RE & Thorner J (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1311–1340.
- 3 Levin DE (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**, 1145–1175.
- 4 Jung US, Sobering AK, Romeo MJ & Levin DE (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* **46**, 781–789.
- 5 García R, Bermejo C, Grau C, Perez R, Manuel Rodríguez-Pena J, Francois J, Nombela C & Arroyo J (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**, 15183–15195.
- 6 Jimenez-Gutierrez E, Alegria-Carrasco E, Sellers-Moya A, Molina M & Martin H (2019) Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int Microbiol* **23**, 107–119.
- 7 Saito H & Posas F (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **192**, 289–318.
- 8 Brewster JL & Gustin MC (2014) Hog 1: 20 years of discovery and impact. *Sci Signal* **7**, re7.
- 9 Hohmann S (2015) An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet* **61**, 373–382.
- 10 Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H & Silver PA (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J* **17**, 5606–5614.
- 11 de Nadal E & Posas F (2015) Osmostress-induced gene expression—a model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription. *FEBS J* **282**, 3275–3285.
- 12 Garcia-Rodriguez LJ, Valle R, Duran A & Roncero C (2005) Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett* **579**, 6186–6190.
- 13 Bermejo C, Rodriguez E, Garcia R, Rodriguez-Pena JM, Rodriguez de la Concepcion ML, Rivas C, Arias P, Nombela C, Posas F & Arroyo J (2008) The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**, 1113–1124.
- 14 Leng G & Song K (2016) Direct interaction of Ste11 and Mkk1/2 through Nst1 integrates high-osmolarity glycerol and pheromone pathways to the cell wall integrity MAPK pathway. *FEBS Lett* **590**, 148–160.
- 15 Delley PA & Hall MN (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* **147**, 163–174.
- 16 Kono K, Saeki Y, Yoshida S, Tanaka K & Pellman D (2012) Proteasomal degradation resolves competition between cell polarization and cellular wound healing. *Cell* **150**, 151–164.
- 17 Bettinger BT, Clark MG & Amberg DC (2007) Requirement for the polarisome and formin function in Ssk2p-mediated actin recovery from osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**, 1637–1648.
- 18 Gerits N, Kostenko S & Moens U (2007) *In vivo* functions of mitogen-activated protein kinases: conclusions from knock-in and knock-out mice. *Transgenic Res* **16**, 281–314.
- 19 Martin H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C & Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 1511–1519.
- 20 Lake D, Correa SA & Muller J (2016) Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway. *Cell Mol Life Sci* **73**, 4397–4413.
- 21 Brandman O & Meyer T (2008) Feedback loops shape cellular signals in space and time. *Science* **322**, 390–395.
- 22 Blount BA, Weenink T & Ellis T (2012) Construction of synthetic regulatory networks in yeast. *FEBS Lett* **586**, 2112–2121.
- 23 Furukawa K & Hohmann S (2013) Synthetic biology: lessons from engineering yeast MAPK signalling pathways. *Mol Microbiol* **88**, 5–19.
- 24 Ingolia NT & Murray AW (2007) Positive-feedback loops as a flexible biological module. *Curr Biol* **17**, 668–677.
- 25 Watanabe Y, Irie K & Matsumoto K (1995) Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **15**, 5740–5749.
- 26 Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE & Gustin MC (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* **270**, 30157–30161.
- 27 Bermejo C, Garcia R, Straede A, Rodriguez-Pena JM, Nombela C, Heinisch JJ & Arroyo J (2010) Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of wsc1 and mid2 deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **14**, 679–688.
- 28 Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palamarczyk G & Francois J (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**, 1147–1166.
- 29 Andrews PD & Stark MJ (2000) Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J Cell Sci* **113**, 2685–2693.

- 30 Denis V & Cyert MS (2005) Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot Cell* **4**, 36–45.
- 31 Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA & Saito H (1997) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biol* **17**, 1289–1297.
- 32 Nagiec MJ & Dohlman HG (2012) Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS Genet* **8**, e1002437.
- 33 Pomeroy JR (2008) Uncovering mechanisms of bistability in biological systems. *Curr Opin Biotechnol* **19**, 381–388.
- 34 Pijnappel WW, Schaft D, Roguev A, Shevchenko A, Tekotte H, Wilm M, Rigaut G, Seraphin B, Aasland R & Stewart AF (2001) The *S cerevisiae* SET3 complex includes two histone deacetylases, Hos2 and Hst1, and is a meiotic-specific repressor of the sporulation gene program. *Genes Dev* **15**, 2991–3004.
- 35 Kim T, Xu Z, Clauder-Munster S, Steinmetz LM & Buratowski S (2012) Set3 HDAC mediates effects of overlapping noncoding transcription on gene induction kinetics. *Cell* **150**, 1158–1169.
- 36 Kim T & Buratowski S (2009) Dimethylation of H3K4 by Set1 recruits the Set3 histone deacetylase complex to 5' transcribed regions. *Cell* **137**, 259–272.
- 37 Cohen TJ, Mallory MJ, Strich R & Yao TP (2008) Hos2p/Set3p deacetylase complex signals secretory stress through the Mpk1p cell integrity pathway. *Eukaryot Cell* **7**, 1191–1199.
- 38 Tripodi F, Nicastro R, Reghellin V & Coccetti P (2015) Post-translational modifications on yeast carbon metabolism: Regulatory mechanisms beyond transcriptional control. *Biochim Biophys Acta* **1850**, 620–627.
- 39 Dihazi H, Kessler R & Eschrich K (2001) Phosphorylation and inactivation of yeast 6-phosphofructo-2-kinase contribute to the regulation of glycolysis under hypotonic stress. *Biochemistry* **40**, 14669–14678.
- 40 Rodicio R, Strauss A & Heinisch JJ (2000) Single point mutations in either gene encoding the subunits of the heterooctameric yeast phosphofructokinase abolish allosteric inhibition by ATP. *J Biol Chem* **275**, 40952–40960.
- 41 Backhaus K, Rippert D, Heilmann CJ, Sorgo AG, de Koster CG, Klis FM, Rodicio R & Heinisch JJ (2013) Mutations in SNF1 complex genes affect yeast cell wall strength. *Eur J Cell Biol* **92**, 383–395.
- 42 Tzagoloff A, Jang J, Glerum DM & Wu M (1996) FLX1 codes for a carrier protein involved in maintaining a proper balance of flavin nucleotides in yeast mitochondria. *J Biol Chem* **271**, 7392–7397.
- 43 Kerscher O, Sepuri NB & Jensen RE (2000) Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* **11**, 103–116.
- 44 Koehler CM, Murphy MP, Bally NA, Leuenberger D, Oppliger W, Dolfini L, Junne T, Schatz G & Or E (2000) Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol Cell Biol* **20**, 1187–1193.
- 45 Chen YC, Cheng TH, Lin WL, Chen CL, Yang WY, Blackstone C & Chang CR (2019) Srv2 is a pro-fission factor that modulates yeast mitochondrial morphology and respiration by regulating actin assembly. *iScience* **11**, 305–317.
- 46 Jin C, Strich R & Cooper KF (2014) Slt2p phosphorylation induces cyclin C nuclear-to-cytoplasmic translocation in response to oxidative stress. *Mol Biol Cell* **25**, 1396–1407.
- 47 Van Wuytswinkel O, Reiser V, Siderius M, Kelders MC, Ammerer G, Ruis H & Mager WH (2000) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol* **37**, 382–397.
- 48 Zhi H, Tang L, Xia Y & Zhang J (2013) Ssk1p-independent activation of Ssk2p plays an important role in the osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: alternative activation of Ssk2p in osmotic stress. *PLoS ONE* **8**, e54867.
- 49 Vazquez-Ibarra A, Subirana L, Ongay-Larios L, Kawasaki L, Rojas-Ortega E, Rodriguez-Gonzalez M, de Nadal E, Posas F & Coria R (2018) Activation of the Hog1 MAPK by the Ssk2/Ssk22 MAP3Ks, in the absence of the osmosensors, is not sufficient to trigger osmotic stress adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J* **285**, 1079–1096.
- 50 Yuzyuk T, Foehr M & Amberg DC (2002) The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. *Mol Biol Cell* **13**, 2869–2880.
- 51 Fernandez-Barrera J & Alonso MA (2018) Coordination of microtubule acetylation and the actin cytoskeleton by formins. *Cell Mol Life Sci* **75**, 3181–3191.
- 52 Reiser V, Salah SM & Ammerer G (2000) Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat Cell Biol* **2**, 620–627.
- 53 van Drogen F & Peter M (2002) Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* **12**, 1698–1703.
- 54 Wilk S, Wittland J, Thywissen A, Schmitz HP & Heinisch JJ (2010) A block of endocytosis of the yeast cell wall integrity sensors Wsc1 and Wsc2 results in reduced fitness *in vivo*. *Mol Genet Genomics* **284**, 217–229.

- 55 Perez AM & Thorner J (2019) Septin-associated proteins Aim44 and Nis1 traffic between the bud neck and the nucleus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytoskeleton (Hoboken)* **76**, 15–32.
- 56 Westfall PJ & Thorner J (2006) Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress: use of an analog-sensitive HOG1 allele. *Eukaryot Cell* **5**, 1215–1228.
- 57 Flandez M, Cosano IC, Nombela C, Martin H & Molina M (2004) Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **279**, 11027–11034.
- 58 Jimenez-Sanchez M, Cid VJ & Molina M (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **282**, 31174–31185.
- 59 Gietz RD & Sugino A (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527–534.
- 60 Fernandez-Pinar P, Aleman A, Sondek J, Dohlman HG, Molina M & Martin H (2012) The Salmonella Typhimurium effector SteC inhibits Cdc42-mediated signaling through binding to the exchange factor Cdc24 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **23**, 4430–4443.
- 61 Soler M, Plovins A, Martin H, Molina M & Nombela C (1995) Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and *in vivo* interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol Microbiol* **17**, 833–842.
- 62 Garcia R, Rodriguez-Pena JM, Bermejo C, Nombela C & Arroyo J (2009) The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **284**, 10901–10911.

Supporting information

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Table S1. Yeast mutant strains included in the screened subcollection.

